

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

Taner BOZKURT

**TURUNİLLERDE BULUNAN BAZI SEKONDER
METABOLİTLERİN BİYOTEKNOLOJİK VE KLASİK
YÖNTEMLERLE ELDESİ, SENTEZDE ROL OYNAYAN
GENLERİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2018

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TURUNÇGİLLERDE BULUNAN BAZI SEKONDER METABOLİTLERİN
BİYOTEKNOLOJİK VE KLASİK YÖNTEMLERLE ELDESİ,
SENTEZDE ROL OYNAYAN GENLERİN MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Taner BOZKURT

DOKTORA TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 18/01/2018 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ
ÜYE

.....
Prof. Dr. Gülfeza KARDAŞ
ÜYE

.....
Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU
ÜYE

.....
Prof. Dr. Sedat Serçe
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FBE2013D4**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve
fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri
Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

DOKTORA TEZİ

**TURUNÇGİLLERDE BULUNAN BAZI SEKONDER METABOLİTLERİN
BİYOTEKNOLOJİK VE KLASİK YÖNTEMLERLE ELDESİ,
SENTEZDE ROL OYNAYAN GENLERİN MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Taner BOZKURT

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
II. Danışman : Prof. Dr. Osman GÜLNAZ
Yıl: 2018, Sayfa: 206
Jüri : Prof. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ
: Prof. Dr. Gülfeza KARDAŞ
: Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU
: Prof. Dr. Sedat SERÇE

Bu tez çalışmasında klasik ve biyoteknolojik yöntemler kullanılarak bazı turuncgillerden sekonder metabolitlerin üretilmesi ve sentezinde rol oynayan genlerin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Klasik yöntemlerle mandarin, limon, portakal, turunc ve altıntop çeşitlerine ait meyve kabuklarından esansiyel yağlar elde edilerek kimyasal bileşimleri analiz edilmiştir. D-limonenin major bileşik ve portakallarda daha yüksek olduğu bulunmuştur. Portakal ve altıntop meyve eksplantları, kallus kültürlerinde kullanılmıştır. Metabolitlerin biyoteknolojik üretiminde farklı bitki büyüme düzenleyicileri ile desteklenmiş katı ve süspansiyon Murashige & Tucker (MT) ortamı kullanılmıştır. Metabolit üretimini artırmak amacı ile sakkaroz, metil jasmonat (MeJA) ve karanlık uygulaması yapılmıştır. Kalluslardan metabolitler ekstrakte edilip toplam fenolik ve naringin miktarları enstrumantal analizler ile yapılmıştır. Sonuç olarak, altıntopun ve albedo eksplantının daha uygun olduğu gözlemlenmiştir. Elisitör uygulamalarında 40g/L sakkaroz daha az etkili olurken 20-30g/L sakkaroz ile 10 µM MeJA'nın metabolit üretimde daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Sentezde rol oynayan genlerin tespiti için Illumina HiSeqTM 2000 ile RNA-Seq analizleri yapılmıştır.

Anahtar kelimeler: Sekonder metabolit, hücre süspansiyon kültürü, RNA-Seq, Turuncgil

ABSTRACT

Ph.D. THESIS

INVESTIGATION OF SOME SECONDARY METABOLITES IN CITRUS FRUITS BY BIOTECHNOLOGICAL AND CLASSICAL METHODS AND GENES INVOLVED IN SYNTHESIS BY MOLECULAR METHODS

Taner BOZKURT

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR
II. Supervisor : Prof. Dr. Osman GÜLNAZ
Year: 2018, Pages: 206
Jury : Prof. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ
: Prof. Dr. Gülfeza KARDAŞ
: Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU
: Prof. Dr. Sedat SERÇE

In this thesis, the production of secondary metabolites in some citrus fruits using classical and biotechnological methods and the genes playing a role in synthesis were investigated. Essential oils were obtained from peels of the varieties of mandarin, lemon, orange, sour orange and grapefruit and their chemical compositions were analyzed. D-lemonene was the major compound and found to be higher in oranges. It was found that d-limonene was the major compound and was higher in oranges. Grapefruit and orange fruit explants have been used in callus cultures. In the biotechnological production of the metabolites, solid and suspension Murashige & Tucker (MT) media supplemented with different plant growth regulators were used. To increase the production of metabolites, sucrose, methyl jasmonate (MeJA) and darkness were applied. The metabolites were extracted from the callus and the total phenolic and naringin amounts were analyzed by instrumental analysis. As a result, it has been observed that grapefruit and albedo explants are more appropriate. It has been found that sucrose 40 g/L was less effective in elicitor applications, while 20-30 g/L sucrose and 10 µM MeJA were more effective in metabolite production. RNA-Seq analyses were performed with Illumina HiSeq™ 2000 for the detection of genes involved in the synthesis.

Key words: Secondary metabolite, cell suspension culture, RNA-Seq, citrus

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Bitkiler genel olarak primer ve sekonder metabolitler olarak sınıflandırılan birçok organik bileşiği sentezlemektedir. Solunum, fotosentez, büyüme ve gelişme ile ilgili temel görevleri olan bileşikler primer metabolitler (fitosteroller, açıl lipidler, nükleotidler, amino asitler gibi) olarak bilinmektedir. Bitkilerin yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkili olmayan sekonder metabolitler, bitki savunmasında ve çevresel uyumda oldukça önemli görevler üstlenmektedir. Özellikle bu metabolitler bitkilerde; tuzluluk, UV ışınları, kuraklık gibi etmenlere karşı koymada, tozlaşma ve tohum dağılımını sağlamak için taşıyıcıları cezbetmede, ek olarak zararlılara karşı bitkinin savunmasında oldukça önemli role sahiptir. Ayrıca bitkiler tarafından üretilen bu kimyasal maddeler insanlar için gıda katkı maddeleri, aromalar, renklendiriciler, insektisitler, ilaçlar, kokular ve diğer kimyasal maddeler olarak yaygın bir biçimde kullanılmakta olan biyolojik aktif maddeler sağlamaktadırlar. Bitki sekonder metabolitleri, çeşitli kimyasal yapılara ve biyolojik aktif maddelere sahip alkaloidler, flavonoidler, terpenoidler ve fenolik bileşikler gibi önemli grupları içermektedirler. Bunlar içerisinde fenolik bileşikler sekonder metabolitlerin en büyük grubunu oluşturmaktadır.

Dünyada ve ülkemizde büyük bir öneme sahip turuncgiller, sekonder metabolitler bakımından oldukça önemli bir yere sahiptir. Turuncgiller, Kuzey Yarıküre’de, Kuzey ve Orta Amerika ile Akdeniz ülkelerinde, Güney Yarıküre’de ise Güney Amerika, Güney Afrika ve Okyanusya’da ekonomik olarak üretilmektedir. Akdeniz ülkeleri arasında önemli bir üretici konumunda olan ülkemiz 2016 yılında 4.293.007 ton turuncgil üretimine sahiptir. Çoğunlukla yaş meyve olarak tüketilen turuncgiller içerdikleri metabolitler (naringenin, d-limonen, naringin, limonin, hesperidin gibi) açısından da tüm dünyada tercih edilmektedir. İnsan sağlığı açısından oldukça faydalı olan bu metabolitler çoğu endüstri alanında da değerlendirilmektedir. Özellikle turuncgil kabuk ve posalarının sahip olduğu metabolitlerin, deterjan, diş macunu, sabun gibi kimya endüstrisinin yanında ilaç

endüstrisinde ve kozmetik sanayide kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Turunçgil sekonder metabolitlerinin elde edilmesi için sıklıkla yetiştirilen bitkisel materyaller ve buna uygun ekstraksiyon metotları kullanılmaktadır. Sekonder metabolitlerin sahip olduğu birçok özellik, bitkilerin yetiştirildikleri ekolojik alanlardan olumlu ya da olumsuz olarak etkilenmektedir. Bu nedenle günümüzde daha kontrollü bitkisel ürün ve sekonder metabolit üretimleri için bitki biyoteknolojisi alanındaki gelişmelerden faydalanılmakta ve *in vitro* doku kültürü çalışmaları tercih edilmektedir. Kallus kültürü, bitkisel materyallerden elde edilen ve bölünme yeteneğini kaybetmemiş doku parçacıklarının uygun karbon kaynağı ve bitki büyüme düzenleyicileri bulunan ortamlarda büyütülmesi olarak tanımlanmaktadır. Kallus kültürüne ek olarak süspansiyon kültürlerinin de sekonder metabolit üretiminde oldukça önemli bir yeri vardır.

Biyoteknolojik çalışmalardaki gelişmeler bitki ve meyve kalitesini etkileyen genlerin moleküler mekanizmasının anlaşılması için de önemli faydalar sağlamış ve bu tür çalışmalar araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Son yıllarda avantajları nedeni ile yeni nesil dizileme teknolojilerinden RNA-Seq analizleri tercih edilmektedir.

Tez çalışması kapsamında, farklı turunçgil tür ve çeşitlerine ait kabuklardan biyoteknolojik ve klasik yöntemler kullanılarak bazı sekonder metabolitlerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Klasik yöntemler yardımı ile meyve kabuklarından esansiyel yağlar elde edilip kimyasal bileşenleri araştırılmıştır. Biyoteknolojik yöntemlerden kallus ve hücre süspansiyon kültürü ile seçili meyveler kullanılarak sekonder metabolitlerin üretilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca elisitör uygulamasının sekonder metabolitler üzerindeki etkisi değerlendirilmiş, sekonder metabolitlerin üretim mekanizmasında rol oynayan genlerin RNA-Seq analizleri ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmalar kapsamında, Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.), Klemantin mandarin (*Citrus clementina*), Meyer limon (*Citrus meyeri*), İnterdonat limon (*Citrus x limon* L. Burm.f.), Moro Kan portakal (*Citrus sinensis* (L.)

Osbeck) ve Turunç (*Citrus aurantium*) sekonder metabolitlerin klasik yöntemlerle elde edilmesi için kullanılmıştır. Washington navel portakal (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) ve Star Ruby altıntop (*Citrus paradisi* Macfadyen) çeşitleri ise hem klasik hem de biyoteknolojik yöntemlerle sekonder metabolitlerin elde edilmesinde kullanılmıştır.

Klasik yöntemlerle sekonder metabolit eldesi için ilk olarak turunçgil kabuklarından esansiyel yağlar su buharı distilasyonu ile elde edilmiştir. Esansiyel yağ miktarının optimum seviyede olması için kabuklara üç farklı ön işlem uygulanmıştır. Blender ile öğütme işleminin esansiyel yağ eldesinde oldukça etkili olduğu ve kan portakalının en yüksek esansiyel yağ yüzdesine (% 4.60 mL/g) sahip olduğu tespit edilmiştir. Gaz kromatografisi-kütle spektrofotometresi (GC-MS) kullanılarak esansiyel yağların kimyasal bileşikleri belirlenmiştir. Analizler sonucunda d-limonenin majör bileşik olduğu ve özellikle portakal çeşitlerinde oldukça yüksek konsantrasyonda olduğu tespit edilmiştir.

Biyoteknolojik yöntemlerle sekonder metabolitlerin elde edilmesi amacı ile kallus kültürü çalışmaları yürütülmüştür. ‘Washington Navel’ portakal ve ‘Star Ruby’ altıntop çeşitlerinin meyvelerine ait farklı dokular (Kabuk, albedo ve meyve kesiti) eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Kinetin ve 2,4D’nin farklı kombinasyon ve konsantrasyonları içeren 12 MT ortamı çalışmalarda kullanılmıştır. En iyi gelişim gösteren 4 kombinasyon sekonder metabolit üretim denemelerinde değerlendirilmiştir. Farklı kültür koşullarında (aydınlık, karanlık) gelişen kalluslar etil alkol ile ekstrakte edilmiştir. Folin Ciocalteu kolorimetrik analiz metodu kullanarak toplam fenolik bileşik ve yine spektrofotometrik bir metod olan Davis testi kullanılarak naringin miktarı belirlenmiştir. Naringin miktarının belirlenmesi için Davis testine ek olarak HPLC analizleri de kullanılmıştır. İki metoda ait sonuçların benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Her iki meyveye ait albedo dokusundan gelişen kalluslarda toplam fenolik bileşik ve naringin miktarının yüksek olduğu tespit edilmiştir. Meyve kesiti dokusundan gelişen kalluslarda ise daha düşük miktarda olduğu belirlenmiştir. Ayrıca aydınlık

kültür koşullarının toplam fenolik bileşik ve naringin miktarı üzerinde pozitif etki gösterdiği belirlenmiştir. Kültür sürelerinin ise bitki büyüme düzenleyicileri ve kültür koşullarına göre farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir. Fenolik bileşik ve naringin üretiminin iyileştirilmesi amacı ile farklı elisitör (Sakkaroz ve MeJA) denemeleri yapılmıştır. Elisitör uygulamaları süspansiyon hücre kültürü denemeleri için de kullanılmıştır. Artan MeJA konsantrasyonunun (7,5-10 μ M) toplam fenolik bileşik ve naringin miktarı üzerinde pozitif etki yaptığı tespit edilmiştir.

Sekonder metabolit üretiminde aktif olan genlerin araştırılması amacı ile yapılan RNA-Seq analizlerinde Illumina HiSeq™ 2000 platformu kullanılmıştır. Toplam 47.51-49.78 Mb arasında ham okuma elde edilmiştir. Toplam temiz okumaların ise 44.89-46.02 Mb arasında olduğu belirlenmiş ve temiz okuma oranının da %92.45-95.61 arasında olduğu tespit edilmiştir. Toplam temiz baz miktarının ise 4.49-4.60 Gb aralığında olduğu bulunmuştur. Elde edilen sekanslar referans genom olan *C. clementina* ile karşılaştırılmıştır. Örnekler arasında farklı seviyelerde ifade olan genlerin GO ve KEGG analizleri gerçekleştirilmiştir. Portakal albedo ve altıntop albedo örnekleri arasında toplam 18319 genin ortak ifade olduğu ve elde edilen sonuçlara göre meyveler arasındaki analizlerden ziyade kallus ile yapılan çalışmalarda daha fazla gen tespit edilmiştir. Kallus ile meyvelerin albedo dokuları birlikte değerlendirilmiş ve 2984-3114 up-regüle, 4086-4399 down-regüle gen gözlemlenmiştir.

KEGG veri bankası kullanılarak gerçekleştirilen analizlere göre sekonder metabolit biyosentezi ile metabolik yolların tüm örnekler arasında var olduğu tespit edilmiştir. Önemli sekonder metabolitler arasında flavonoidlerin biyosentezi ile ilişkili yolların varlığı tüm örnek kombinasyonları arasında belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Doktora tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarımnda bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Yıldız AKA KAÇAR'a ve sekonder metabolitlerin ekstraksiyonu ile ilgili çalışmalarda desteğini gördüğüm ikinci danışmanım Prof. Dr. Osman GÜLNAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmalarım boyunca katkı ve görüşleri ile beni yönlendiren Tez İzleme Komitesi üyesi hocalarım Sayın Prof. Dr. Yeşim YALÇIN MENDİ ve Sayın Prof. Dr. Gülfeza KARDAŞ'a teşekkür ederim.

Doktora tezimin değerlendirmesinde değerli katkılarını sunan hocalarım sayın Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU'na ve Prof. Dr. Sedat SERÇE'ye teşekkür ederim.

In vitro doku kültürü çalışmalarını yürüttüğüm Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürlüğü'ne ve çalışmalarımnda yardımcı bulunan çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Enstrümental analizlerin büyük bir kısmının yürütüldüğü Bozkurt Biyoteknoloji Ar-Ge firması laboratuvarında yardımları bulunan çalışma arkadaşım ve diğer arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim boyunca büyük bir sabır ve özveri ile maddi manevi desteğini esirgemeyen Aileme ve özellikle Anneme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER.....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XV
SİMGELER VE KISALTMALAR	XVII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Bitki metabolitleri.....	3
1.1.1. Azot İçeren Bileşikler (Alkoloidler).....	4
1.1.2. Fenolikler.....	4
1.1.2.1. Stilbenler.....	4
1.1.2.2. Flavanoidler	5
1.1.3. Terpenler.....	8
1.1.3.1. Esansiyel Yağlar	9
1.2. Sekonder Metabolit Ekstraksiyon Yöntemleri	10
1.2.1. Konvansiyonel Ekstraksiyon Teknikleri.....	10
1.2.2. Konvansiyonel Olmayan Ekstraksiyon Teknikleri.....	12
1.3. Sekonder Metabolitlerin Biyoteknolojik Üretim Yöntemi	14
1.3.1. Bitki Doku Kültürü.....	14
1.4. Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri	16
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	19
2.1. Sekonder Metabolitlerin Klasik Yöntemlerle Eldesi İle İlgili Yürütülen Çalışmalar.....	19
2.2. Sekonder Metabolitlerin Biyoteknolojik Yöntemlerle Eldesi İle İlgili Yürütülen Çalışmalar.....	24

2.3. RNA-seq İle İlgili Yürütülen Çalışmalar.....	28
3. MATERYAL VE METOD	33
3.1. Bitkisel Materyal	33
3.1.1. Satsuma Mandarin (C. unshiu Marc.).....	33
3.1.2. Klemantin Mandarin (Citrus clementina).....	33
3.1.3. Meyer Limonu (Citrus meyeri).....	33
3.1.4. İnterdonat Limonu (Citrus x limon L. Burm.f.).....	34
3.1.5. Turunç (Citrus aurantium)	34
3.1.6. Washington Navel Portakalı (Citrus sinensis (L.) Osbeck).....	34
3.1.7. Kan Portakalı (Citrus sinensis (L.) Osbeck).....	34
3.1.8. Star Ruby Altıntop (Citrus paradisi Macfadyen).....	35
3.2. Yöntem	35
3.2.1. Klasik Yöntemlerle Sekonder Metabolitlerin	
Elde Edilmesi.....	35
3.2.1.1. Esansiyel Yağların Elde Edilmesi	35
3.2.1.2. Esansiyel Yağların Kimyasal Analizleri.....	38
3.2.2. Biyoteknolojik Yöntemlerle Sekonder Metabolitlerin	
Elde Edilmesi.....	39
3.2.2.1. Kallus Kültürü	39
3.2.2.1.(1). Kültür Ortamları ve Sterilizasyon	
Çalışmaları.....	39
3.2.2.1.(2). Örneklerinin Kültüre Alınması	42
3.2.2.1.(3). Kallus Gelişimi için Uygun Bitki Büyüme	
Düzenleyicilerinin Belirlenmesi.....	43
3.2.2.1.(4). Sekonder Metabolit Üretimini Artırmak	
İçin Yapılan Çalışmalar.....	44
3.2.2.2. Süspansiyon Hücre Kültürleri	44
3.2.3. Sekonder Metabolitlerin Ekstraksiyonu	46
3.2.4. Sekonder Metabolitlerin Enstrümental Analizleri	47

3.2.4.1. Toplam Fenolik Bileşiklerin Belirlenmesi.....	47
3.2.4.2. Naringin Miktarının Belirlenmesi	48
3.2.4.3. Naringin Miktarının HPLC Analizleri.....	48
3.2.5. Moleküler Analiz Çalışmaları	50
3.2.5.1. RNA İzolasyonu	50
3.2.5.2. RNA Kalite ve Miktarının Belirlenmesi	52
3.2.5.3 RNA Sekanslama Analizleri.....	52
3.2.5.3.(1). Sekans Okumalarının Filtrelenmesi	55
3.2.5.3.(2). Genom Haritalama ve Referans Genom İle Sekansların Hizalanması	55
3.2.5.3.(3). RNA Gen Ekspresyon Analizleri.....	55
3.2.5.3.(4). Farklı Seviyelerde İfade Olan Genlerin (DEGs) Belirlenmesi ve Gen Ontoloji (GO) Analizleri	56
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	57
4.1. Klasik Yöntemlerle Sekonder Metabolitlerin Elde Edilmesi	57
4.1.1. Esansiyel Yağlara Ait Kimyasal Bileşiklerin Belirlenmesi.....	59
4.2. Biyoteknolojik Yöntemlerle Sekonder Metabolitlerin Elde Edilmesi.....	61
4.2.1. Kallus Kültürü	61
4.2.1.1. Uygun Eksplant, Besi Ortamı ve Kültür Şartlarının Belirlenmesi.....	61
4.2.1.2. Sekonder Metabolitlerin Biyoteknolojik Üretimi için Gerekli Kallusların Geliştirilmesi	70
4.3. Sekonder Metabolitlerin Enstrümental Analiz Bulguları	71
4.3.1. Kallus Kültürlerinde Toplam Fenolik Bileşik ve Naringin Miktarı	71
4.3.1.1. Elisitör Uygulamalarının Toplam Fenolik Bileşik ve Naringin Miktarı Üzerindeki Etkileri	81

4.3.2. HPLC Analizlerine Göre Naringin Miktarının	
Değerlendirilmesi.....	97
4.3.3. Süspansiyon Hücre Kültürlerinde Toplam Fenolik Bileşik	
ve Naringin Miktarı.....	100
4.4. Moleküler Analizler.....	105
4.4.1. RNA İzolasyonu	105
4.4.2. RNA Sekans Analizleri	107
4.4.2.1. Gen Ekspresyon Analizleri.....	108
4.4.2.2. Farklı Seviyelerde İfade Olan Genlerin (DEGs)	
Belirlenmesi.....	112
4.4.2.3. Farklı Seviyelerde İfade Olan Genlerin	
Ontoloji (GO) Analizleri	115
4.4.2.4. Farklı Seviyelerde İfade Olan Genlerin	
Yolak Analizleri	119
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	129
KAYNAKLAR.....	137
ÖZGEÇMİŞ.....	151
EKLER	152

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1.	Turunçgil üretim miktarının yıllara göre dağılımı (FAO, 2017)	1
Çizelge 1.2.	Türkiye turunçgil türlerinin yıllara göre üretim miktarı (FAO, 2017).....	2
Çizelge 1.3.	Farklı sekonder metabolitlerin <i>in vitro</i> üretimi	15
Çizelge 3.1.	Gaz Kromatografisi-Kütle spektrometre koşulları	39
Çizelge 3.2.	Yüzey sterilizasyon aşamaları	40
Çizelge 3.3.	MS tuzlarına (Murashige ve Skoog, 1962) ait makro-mikro elementler ve MT vitamin içeriği	41
Çizelge 3.4.	Elisitör denemelerinde kullanılan ortamlar ve ortamlara eklenen elisitör miktarları	44
Çizelge 3.5.	Naringin analizinde kullanılan HPLC sistemi ve Kromatografi koşulları	49
Çizelge 4.1.	Turunçgil kabuklarına ait % esansiyel yağ verimleri (mL/g)	57
Çizelge 4.2.	Turunçgil esansiyel yağlarının sahip olduğu ortak kimyasal bileşiklerden bazıları	60
Çizelge 4.3.	Aydınlık kültür koşullarında farklı bitkisel materyal, eksplant ve ortamlarda gelişen kallusların oranı (%).....	64
Çizelge 4.4.	Aydınlık kültür koşullarında farklı bitkisel materyal, eksplant ve ortamlarda gelişen kallusların ağırlık oranı	65
Çizelge 4.5.	Karanlık kültür koşullarında farklı bitkisel materyal, eksplant ve ortamlarda gelişen kallusların oranı (%).....	66
Çizelge 4.6.	Karanlık kültür koşullarında farklı bitkisel materyal, eksplant ve ortamlarda gelişen kallusların ağırlık oranı	67
Çizelge 4.7.	MT besin ortamına eklenen bitki büyüme düzenleyicileri ile ortamlara verilen kısa kodlar	70

Çizelge 4.8. Farklı ortam ve kültür koşullarında gelişen portakal kalluslarının altkültürler boyunca toplam fenolik ve naringin miktarı	73
Çizelge 4.9. Farklı ortamlar ve altkültürlerde gelişen portakal kalluslarının aydınlık ve karanlık kültür koşullarındaki fenolik bileşik ve naringin miktarı	75
Çizelge 4.10. Farklı ortam ve kültür koşullarında gelişen altıntop kalluslarının altkültürler boyunca toplam fenolik ve naringin miktarı	77
Çizelge 4.11. Farklı ortamlar ve altkültürlerde gelişen altıntop kalluslarının aydınlık ve karanlık kültür koşullarındaki fenolik bileşik ve naringin miktarı	79
Çizelge 4.12. Portakal kalluslarında farklı sakkaroz uygulamalarının toplam fenolik bileşik ve naringin miktarı üzerine etkisi	83
Çizelge 4.13. Portakal kalluslarında farklı sakkaroz uygulamaları ile kültür koşullarının toplam fenolik bileşik ve naringin miktarı üzerine etkisi	85
Çizelge 4.14. Altıntop kalluslarında farklı sakkaroz uygulamalarının toplam fenolik bileşik ve naringin miktarı üzerine etkisi	87
Çizelge 4.15. Altıntop kalluslarında farklı sakkaroz uygulamaları ile kültür koşullarının toplam fenolik bileşik ve naringin miktarı üzerine etkisi	88
Çizelge 4.16. Portakal kalluslarında metil jasmonat uygulamalarının toplam fenolik bileşik ve naringin miktarı üzerine etkisi	91
Çizelge 4.17. Portakal kalluslarında metil jasmonat uygulamaları ile kültür koşullarının toplam fenolik bileşik ve naringin miktarı üzerine etkisi	92
Çizelge 4.18. Altıntop kalluslarında metil jasmonat uygulamalarının toplam fenolik bileşik ve naringin miktarı üzerine etkisi	94

Çizelge 4.19. Altıntop kalluslarında metil jasmonat uygulamaları ile kültür koşullarının toplam fenolik bileşik ve naringin miktarı üzerine etkisi	95
Çizelge 4.20. Portakal ekstraktlarına ait HPLC ve Davis testleri ile elde edilen naringin miktarı (mg/g yaş ağırlık).....	98
Çizelge 4.21. Altıntop ekstraktlarına ait HPLC ve Davis testleri ile elde edilen naringin miktarı (mg/g yaş ağırlık).....	99
Çizelge 4.22. Albedo kalluslarına ait süspansiyon hücre kültürlerinde sakkaroz uygulamalarının toplam fenolik bileşik ve naringin miktarı üzerine etkisi.....	102
Çizelge 4.23. Albedo kalluslarına ait süspansiyon hücre kültürlerinde MeJA uygulamalarının toplam fenolik bileşik ve naringin miktarı üzerine etkisi	103
Çizelge 4.24. Ekstrakte edilen RNA örneklerinin Nanodrop ile yapılan ölçümlerine ait sonuçlar	106
Çizelge 4.25. RNA-seq analizleri ile elde edilen okumalara ait veriler	108
Çizelge 4.26. Örnekler arasındaki gen ifadesi korelasyonuna ait değerler.....	109
Çizelge 4.27. Portakal albedo ve altıntop albedo örnekleri arasında tespit edilen önemli yolaklardan bazıları	123
Çizelge 4.28. Portakal albedo ve kallus örnekleri arasında tespit edilen önemli yolaklardan bazıları	124
Çizelge 4.29. Altıntop albedo ve kallus örnekleri arasında tespit edilen önemli yolaklardan bazıları	125



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1.	Flavonoidlerin kimyasal yapısı	6
Şekil 1.2.	Naringin'in kimyasal yapısı (EFSA, 2011).....	8
Şekil 1.3.	Naringenin'in kimyasal yapısı (Wang ve ark., 2015).....	8
Şekil 1.4.	D-limonen'in kimyasal yapısı.	10
Şekil 1.5.	Hidrodistilasyon çalışmalarında kullanılan cleverger aparatı (Bicchi ve Maffei, 2012)	12
Şekil 3.1.	Meyve kabuklarının çıkarılması	36
Şekil 3.2.	Esansiyel yağların elde edilmesi ve muhafazası	37
Şekil 3.3.	Esansiyel yağların kimyasal bileşimlerini belirlemek için kullanılan GC-MS sistemi	38
Şekil 3.4.	Meyvelerin yüzey sterilizasyonu	40
Şekil 3.5.	Eksplantların kültür ortamlarına aktarılması	42
Şekil 3.6.	Kallusların muhafaza edilmesi	43
Şekil 3.7.	Süspansiyon hücre kültürleri	45
Şekil 3.8.	Kallusların ekstraksiyona hazır hale getirilmesi.....	46
Şekil 3.9.	Sekonder metabolitlerin ekstraksiyonu	47
Şekil 3.10.	Toplam fenolik bileşik analizleri.....	48
Şekil 3.11.	Naringin analizlerinde kullanılan HPLC sistemi.....	49
Şekil 3.12.	Bitkisel kabuk dokularının öğütülmesi.....	50
Şekil 3.13.	RNA-Seq analizlerinde kullanılan sistemler	54
Şekil 3.14.	Biyoinformatik analizlerinde iş akış diyagramı	54
Şekil 4.1.	Aydınlık kültür koşullarında 'Washington Navel' portakal ve 'Star Ruby' altıntop meyve eksplantlarından gelişen kalluslar	62
Şekil 4.2.	Karanlık kültür koşullarında 'Washington Navel' portakal ve 'Star Ruby' altıntop meyve eksplantlarından gelişen kalluslar	62
Şekil 4.3.	Kallusların geliştirilmesi ve büyüyen kallusları parçalara ayrılarak alt kültüre alınması.....	70

Şekil 4.4.	Gallik Asit'e ait kalibrasyon grafiği	71
Şekil 4.5.	Naringin'e ait kalibrasyon grafiği	72
Şekil 4.6.	HPLC'de naringin kalibrasyon eğrisi.....	97
Şekil 4.7.	Süspansiyon hücre kültürlerinde gelişen kalluslardan ortamların uzaklaştırılması ve ekstraksiyonu	101
Şekil 4.8.	İzole edilen RNA'ların agaroz jeldeki görüntüsü.....	106
Şekil 4.9.	İzole edilen RNA'ların agaroz jeldeki görüntüsü Agilent Bioanalyzer 2100 ile yürütülen RNA analizlerine ait sonuçlar	107
Şekil 4.10.	Gen ifadesinin örnekler arasındaki korelasyonu	109
Şekil 4.11.	Örneklerin gen ifadeleri açısından kümelenmesini gösteren dendrogram.....	110
Şekil 4.12.	Örnekler arasında ifade edilen genlerin analizi	111
Şekil 4.13.	Farklı ifade olan genlerin örnekler arasındaki durumu	113
Şekil 4.14.	Farklı ifade olan genlerin örnekler arasındaki HeatMap görüntüleri	114
Şekil 4.15.	Portakal albedo ve altıntop albedo örnekleri arasında oluşturulan gen ontoloji şeması	116
Şekil 4.16.	Portakal albedo ve kallus örnekleri arasında oluşturulan gen ontoloji şeması.....	117
Şekil 4.17.	Altıntop albedo ve kallus örnekleri arasında oluşturulan gen ontoloji şeması.....	118
Şekil 4.18.	Portakal albedo ile altıntop albedo örnekleri arasındaki genlerin katıldığı yollar	120
Şekil 4.19.	Portakal albedo ile kallus örnekleri arasındaki genlerin katıldığı yollar	121
Şekil 4.20.	Altıntop albedo ile kallus örnekleri arasındaki genlerin katıldığı yollar	122
Şekil 4.21.	Portakal albedo ve altıntop albedo arasında tespit edilen flavonoid biyosentezi yolağı	128

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
2,4 D	: 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid
ABC	: ATP-Bağlayıcı Kaset
AQ	: Antrakinin
BA	: 6-Benzil Adenin
cm	: Santimetre
COG	: Cluster of Orthologous Groups
CTAB	: Sietiltrimetil Ammiyum Bromid
DEGs	: Differentially Expressed Genes
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DPPH	: 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DW	: Dry Weight
EAAE	: Enzyme-Assisted Aqueous Extraction
EACP	: Enzyme-Assisted Cold Pressing
EDTA	: Etilen daimin tetra asedik asit
EFSA	: European Food Safety Authority
EtOH	: Etanol
FAO	: Food and Agriculture Organization
FID	: Flame Ionization Detector
FPKM	: Fragments Per Kilobase of Exon Per Million Fragments Mapped
g	: Gram
GC	: Gas Chromatography
GC-MS	: Gas Chromatography-Mass Spectrometry
GHz	: Gigahertz
GO	: Gene Ontoloji

HgCl ₂	: Mercury (II) Chloride
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
HS-SPME	: Headspace-Solid Phase Microextraction
KEGG	: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
kg	: Kilogram
L	: Litre
LC-MS	: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
M	: Molarite
Mbp	: Megabase Pair
MeJA	: Metil Jasmonat
Mg	: Miligram
MHz	: Megahertz
mL	: Mililitre
M.Ö.	: Milattan Önce
MPa	: Megapascal
MS	: Murashige ve Skoog
MT	: Murashige ve Tucker
NaOCl	: Sodium Hypochlorite
NAA	: Naphthalene Acetic Acid
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
nm	: Nanometre
Ppm	: Parts Per Million
PVP	: Polyvinylpyrrolidone
qRT-PCR	: Quantitative Real Time- Polymerase Chain Reaction
RNA-Seq	: RNA Sequencing
SC-CO ₂	: Süperkritik Kabondioksit
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism

TDZ	: Thidiazuron
TLC	: Thin-Layer Chromatography
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UV	: Ultraviyole
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
w/w	: Weight/Weight
w/v	: Weight/Volum



1. GİRİŞ

Turunçgiller ülkemizde ve dünyada en fazla üretimi yapılan meyvelerin başında gelmektedir. Asıl anavatanı Güneydoğu Asya olan turunçgiller, Arap Yarımadası'nın doğusundan, Filipinler'in doğusuna kadar ve Himalayalar ile Hindistan'dan Avustralya'ya kadar olan bölgeyi kapsayan geniş bir coğrafyaya yayılmışlardır (Kafa ve Canihoş, 2010).

Dünya turunçgil kuşağı, 35° Kuzey ve Güney enlemleri arasında bulunmaktadır. Kuzey Yarımküre'de, Kuzey ve Orta Amerika ile Akdeniz ülkelerinde, Güney Yarımküre'de ise Güney Amerika, Güney Afrika ve Okyanusya'da ekonomik olarak üretilmektedir. Turunçgil üretimi yapan ülkeler arasında en büyük üretici Brezilya iken onu sırası ile ABD, Çin, Meksika, İspanya ve Hindistan izlemektedir (Karahocagil, 2003). Akdeniz ülkeleri arasında önemli bir üretici konumunda olan Türkiye 2016 yılında 4.293.007 ton turunçgil üretimine sahiptir. Dünya turunçgil üretiminde olduğu gibi Türkiye'de de turunçgil üretiminin sürekli arttığı görülmektedir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Turunçgil üretim miktarının yıllara göre dağılımı (FAO, 2017)

Yıllar	Türkiye (ton)	Dünya (ton)
2010	3.572.376	129.263.266
2011	3.613.766	134.020.206
2012	3.475.028	134.241.631
2013	3.681.158	141.682.421
2014	3.783.517	140.444.729
2015	3.975.873	144.876.944
2016	4.293.007	146.429.018

Çizelge 1.2. Türkiye turunçgil türlerinin yıllara göre üretim miktarı (FAO, 2017)

Yıllar	Üretim Miktarı (ton)				
	Altıntop	Limon	Portakal	Mandarin	Diğer
2010	213.768	787.063	1.710.500	858.699	2.346
2011	218.988	790.211	1.730.146	872.251	2.170
2012	226.738	710.211	1.661.111	874.832	2.136
2013	228.799	726.283	1.781.258	942.226	2.592
2014	229.555	725.230	1.779.675	1.046.899	2.158
2015	250.025	750.550	1.816.798	1.156.365	2.135
2016	253.120	850.600	1.850.000	1.337.037	2.250

Türkiye’de üretilen turunçgil türleri arasında portakal en yüksek üretime sahipken onu mandarin ve limon izlemektedir (Çizelge 1.2). TÜİK verilerine göre ise portakal üretiminin 2016 yılında 1.850.000 ton olduğu ve toplam turunçgil üretiminin 4.293.007 tona ulaştığı bildirilmektedir (TÜİK, 2017). Turunçgil üretiminin önemli kısmı yurt içinde kullanılırken bir kısmı da ihraç edilmektedir. TÜİK 2015-2016 yılı verilerine göre 2.489.368 ton ürün yurt içinde kullanılırken 1.741.021 ton ürün ihraç edilmiştir (TÜİK, 2017).

Hem dünyada hem de ülkemizde önemli bir yere sahip olan turunçgiller çoğunlukla yaş meyve olarak tüketilmekte ve insan sağlığı için ayrıca tercih edilmektedir. Ek olarak turunçgiller, içerdikleri bitki metabolitleri (D-limonen, naringin, limonin, aropten, hesperidin gibi) ile de oldukça önemli bir değere sahiptir. Diğer yandan bütün meyve, meyve kabuğu, meyve suyu veya işlenmiş ürünlerden geriye kalan posalar tekrar değerlendirilerek genellikle katma değeri düşük ürünler elde edilmektedir.

Turunçgiller sahip oldukları metabolitler sebebi ile deterjan, diş macunu, sabun gibi kimya endüstrisinin yanında ilaç endüstrisinde ve kozmetik sanayide de önemli kullanım alanlarına sahiptir (Raeissi ve Peters, 2005). Turunçgillerde

olduğu gibi çoğu bitki türü, içerdiği metabolitler sayesinde de ayrıca değer kazanmakta ve birçok sanayi kolunda kullanılmaktadır. Bu nedenle bitkilere ait metabolitlerin ayrıca incelenmesi ve araştırılması gün geçtikçe araştırmacıların daha çok ilgisini çekmektedir.

1.1. Bitki Metabolitleri

Bitki metabolitleri genellikle primer ve sekonder metabolitler (nükleik asitler bu sınıflama dışındadır) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Primer metabolitler (yağlar, karbonhidratlar, proteinler gibi) doğada yaygın olup, yüksek bitkilerin tohum ve vejetatif dokularında oldukça fazladır. Bunlar, hücre metabolizmasındaki temel görevleri nedeniyle bitkinin fizyolojik gelişimi için gereklidirler.

Önceleri hiçbir işlevi olmayan, tesadüfi veya fazlalık olarak bilinen sekonder metabolitler, bitkiler tarafından üretilen ve bitkinin temel yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkisi olmayan, buna karşılık en az primer metabolitler kadar önemli kimyasal maddelerdir. Birçok görevi olan bu metabolitlerin bitkilerdeki işlevleri şu şekilde özetlenebilir:

- Tuzluluk, kuraklık, ultraviyole (UV) ışınları gibi farklı çevre faktörlerinin neden olduğu stres ortamına karşı koyma,
- Mikroorganizmalara (bakteriler, mantarlar, virüsler vb.) karşı savunma,
- Herbivorlara (sürüngeler, böcekler vb.) karşı savunma,
- Bazı metabolik ve daha gelişmiş ekolojik işlevler (örneğin; tohum dağılımını sağlamak için hayvanları ve diğer taşıyıcıları cezbetme gibi) (Mammadov, 2014; Sökmen ve Gürel, 2001).

Bitki sekonder metabolitleri genellikle sentez yollarına göre sınıflandırılmaktadır (Harborne, 1999; Bourgaud ve ark., 2001). Temel olarak bu

metabolitler 3 ana gruba ayrılmakta ve şu şekilde sınıflandırılabilir; azot içeren bileşikler (alkaloidler ve glukozinolatlar gibi), fenolikler (fenolik asitler, kumarinler, stilbenler, flavonoidler, taninler, ligninler gibi) ve terpenler (bitki uçucu bileşikler, kardiyak glikozitler, karotenoidler ve steroller gibi) (Agostini-Costa ve ark., 2012).

1.1.1. Azot İçeren Bileşikler (Alkaloidler)

Birçok metabolit yapısında bir veya daha fazla azot atomu içermektedir. Bu azotlu bileşikler arasında alkaloidler, siyanojenik glukozitler, glukozinolatlar en önemlileri arasındadır. Alkaloidler güçlü farmakolojik etki gösteren heterosiklik bileşiklerdir. Glukozinolatlar bir sülfür atomu içeren bileşiklerdir. Oldukça önemli olan siyanojenik glukozitler, insan ve hayvanlar için gıda olarak tüketilen birçok bitkide bulunmaktadır. Bu bitki dokuları tahrip edildiğinde hidrojen siyanür açığa çıkar ve siyanür zehirlenmesine neden olur. Alkaloidler ise yüzyıllardır insanlar tarafından bilinmekte ve kullanılmaktadır. Kodein ve morfin içeren *Papaver somniferum* (haşhaş) lateksinin Ortadoğu'da M.Ö. 1200-1400 yıllarında dahi kullanıldığı bilinmektedir (Kriaa, 2013; Alvarez, 2014).

1.1.2. Fenolikler

Fenolikler, yapısında aromatik halkanın karbon atomları ile birleşmiş bir veya daha fazla hidroksil grubunu bulunduran, aromatik bileşenlerdir (Alvarez 2014; Mammadov, 2014). Aromatik halkaya bağlı hidroksil grubu sayısı bir ise fenol, daha fazla ise polifenol olarak adlandırılmaktadır (Mammadov, 2014). Sekonder metabolitlerin büyük bir kısmını oluşturan fenolik bileşikler, stilbenler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Alvarez, 2014).

1.1.2.1. Stilbenler

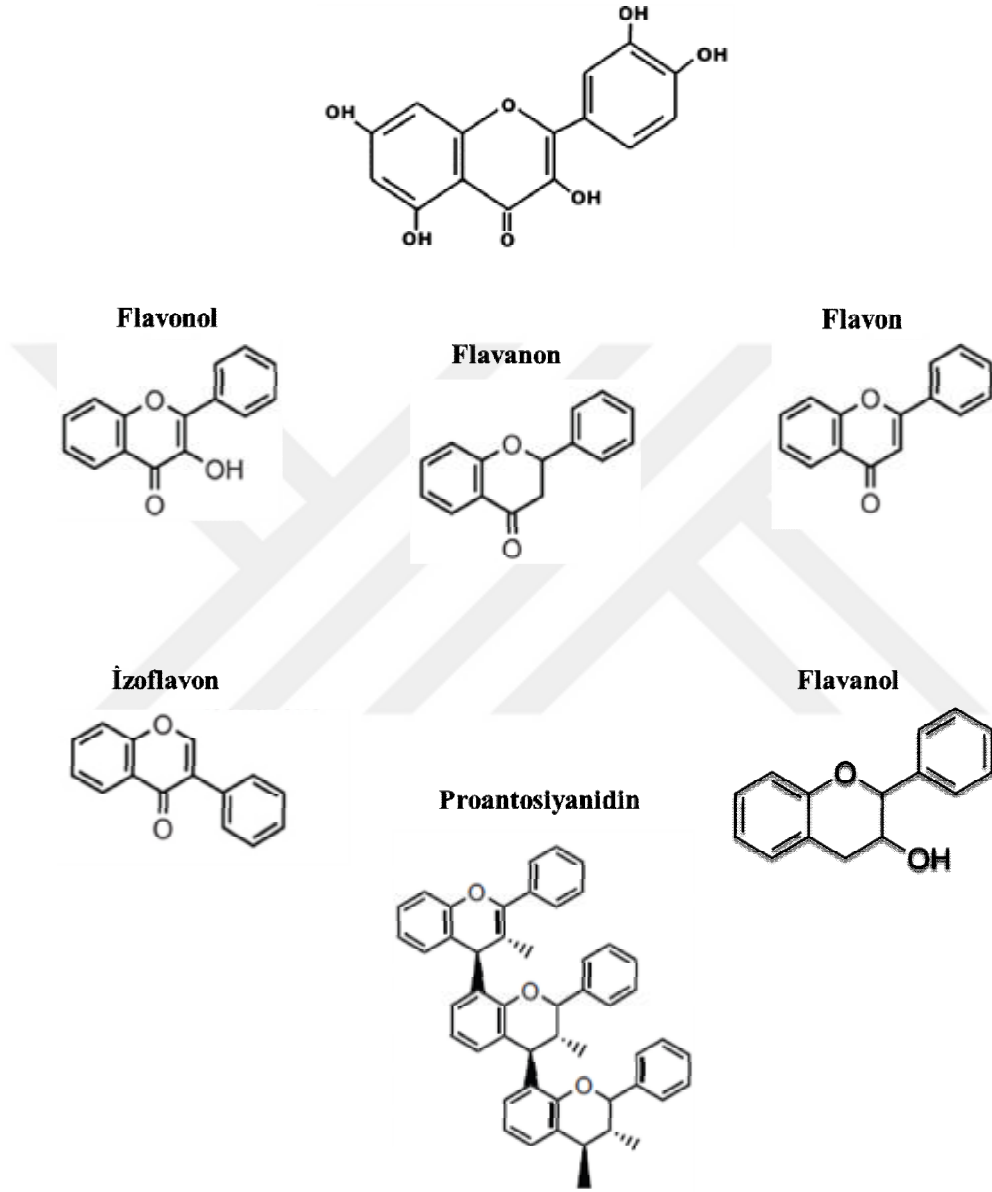
Bitki savunmasında görev alan stilbenler, fenoliklerin küçük bir grubunu oluşturmaktadır. Resveratrol en yaygın olanıdır. *Trans* ve *cis* izomerlerine sahip,

strese (yaralanma gibi) yanıt olarak üretilmektedir. İki izomerden en fazla bulunanı *Trans*-resveratrol olup insanlarda kronik hastalıklara karşı antioksidan aktiviteye sahiptir (Bradamante ve ark., 2004). Ayrıca kanserin belirli türlerine (Aggarwal ve ark., 2004; Kundu ve Surh, 2008), diabete (Sharma ve ark., 2007) ve nöro-dejeneratif hastalıklara (Anekonda, 2006; Pearson ve ark., 2008) karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (Alvarez, 2014).

1.1.2.2. Flavanoidler

Flavonoidler, temel yapısı C6-C3-C6 iskeletine sahip olan polifenolik bileşiklerin bir alt grubunu oluşturmaktadır. Sarı renkli olmaları sebebi ile Latince sarı anlamına gelen 'flavus' sözcüğünden türetilip 'flavonoid' adı verilmiştir. Flavonoidler, *Rutaceae*, *Fabaceae*, *Polygonaceae*, *Umbelliferae*, *Compositae* gibi familyalarda yaygın olarak bulunan genellikle sarı, kırmızı veya mavi renkli pigmentler olarak bilinirler. Farklı yapıda 6000'den fazla flavonoid tespit edilmiş ve bu sayının gün geçtikçe artmakta olduğu bildirilmiştir (Ferrer ve ark., 2008; Ferreyra ve ark., 2012).

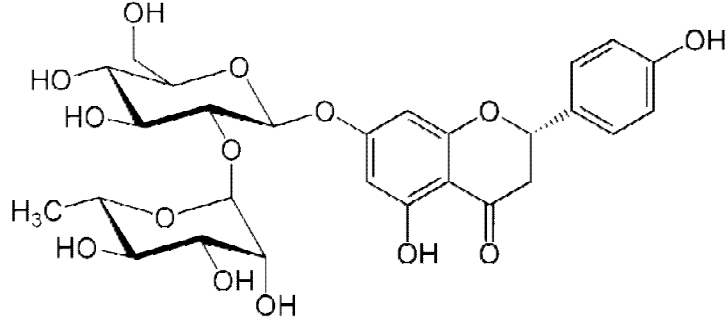
Bitkilerde yaygın olarak bulunan bu metabolitler yedi ana grupta sınıflandırılmaktadır: antosiyaninler, flavonoller, flavanonlar, proantosiyaninler, flavanoller, flavonlar ve izoflavonlar'dır (Murphy ve ark., 2003; Lakhanpal ve Rai, 2007) (Şekil 1.1.).

FLAVONOİDLER

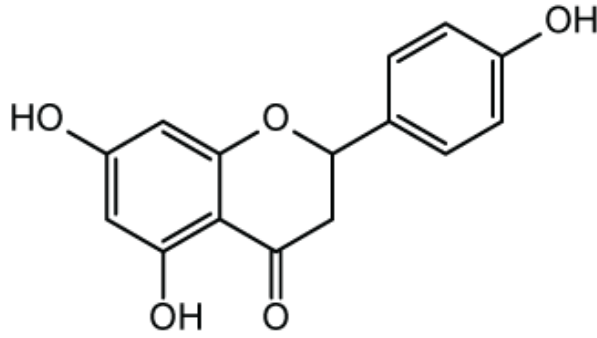
Şekil 1.1. Flavonoidlerin kimyasal yapısı

Birçok biyolojik fonksiyona sahip olan flavonoidler; fitopatojen ve UV ışınlamından bitkiyi korumada, oksin taşınımında, polinatör böceklerin çekiminde, meyve ve çiçek renginin oluşmasında aktif görevlere sahiptir (Mol ve ark., 1998; Winkel-Shirley, 2002; Bradshaw ve Schemske, 2003). Ayrıca yaşlanma sırasında besin alımının artırılmasından ve fotooksidatif zararlardan yaprak hücrelerinin korunması sağlayacak sonbahar renklerinin oluşmasından sorumludur (Feild ve ark., 2001). İnsan sağlığı üzerinde de önemli görevleri olan flavonoidler; antioksidan, antiviral, antialerjik, tümör oluşumunu, şeker hastalığını ve iltihabı önleyici, antimikrobiyal ve enzim inhibe edici olarak tıp alanında kullanılmaktadır.

Flavonoidlerin başlıca çeşidini oluşturan flavanonlar, genellikle aglikon veya glikozid formda meyve ve bitkilerde bulunmaktadır. Birçok bitkide belli seviyelerde bulunsalar da en çok turuncgillerde bulunmaktadır. Portakal, temel glikozidler olarak naringin ve hesperidin içermektedir. Flavanonların en yaygın üyelerinden olan naringin ile onun aglikonu naringenin ise turuncgil perikarpında doğal olarak bulunmakta ve özellikle altıntopta (*C. paradisi*) meyveyle ilişkili olarak karakteristik aromasını vermektedir (Şekil 1.2, Şekil 1.3). Naringin, turuncgillerde acı tadın oluşmasını sağlayan önemli bileşiklerdendir. Turuncgillerin işlenmesi sonucu elde edilen ürünlerde naringin çok az konsantrasyonda olsa bile hissedilebilmektedir. Portakallarda bulunan, tatsız olan hesperidin ve turunclardaki acı tada neden olan neohesperidin ile yakından ilişkilidir. Molekül formülü $C_{27}H_{32}O_{14}$, molekül ağırlığı ise 580.54 g/mol'dür. Erime noktası 83°C olup yoğunluğu 1.66 g/cm³'tür (Şekil 1.2). Suda (0,1 g/L) ve etanolde kolayca çözünebilmektedir (EFSA, 2011).



Şekil 1.2. Naringin'in kimyasal yapısı (EFSA, 2011)



Şekil 1.3. Naringenin'in kimyasal yapısı (Wang ve ark., 2015)

1.1.3. Terpenler

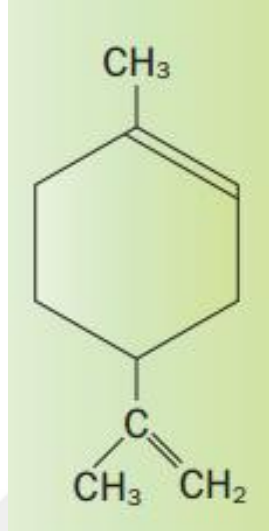
Terpenler (terpenoidler veya izoprenoitler), izopren moleküllerinin 'kafa-kuyruk' şeklinde birleşmesi ile meydana gelmektedir. Bitkilerde sekonder metabolit olarak, 30.000 kadar bileşeni ile en büyük grubu oluşturmaktadırlar. Beşli karbon birimlerine göre sınıflandırılırlar; hemiterpenler (C₅), monoterpenler (C₁₀), seskiterpenler (C₁₅), diterpenler (C₂₀), triterpenler (C₃₀), tetraterpenler (C₄₀) ve politerpenler (80 karbondan fazla). Terpenlerin çoğu halka yapısına sahiptir. Aroma ve parfümeri endüstrilerinde kullanılan bitki esansiyel yağları monoterpenlerin majör bileşenleridir (Alvarez, 2014).

1.1.3.1. Esansiyel Yağları

İyi bir C vitamini kaynağı olan turunçgiller, içerdikleri esansiyel yağlar bakımından da bir o kadar değer taşımaktadır. Esansiyel yağlar sıvı formda olup, uçucu ve güçlü kokuya sahip maddelerdir. Organik çözücülerde kolaylıkla çözünmelerine karşın suda çözünmezler. Bu esansiyel yağlar bitkinin yaprak, meyve, kabuk, meyve sapı gibi organlarında ya da bitkinin tüm organlarında bulunabilmektedirler. Turunçgil yağları, gıda, kozmetik, ilaç ve kimya endüstrisinde önemli kullanım alanlarına sahip olup (Raeissi ve Peters, 2005) etkin bir şekilde antimikrobiyal etki göstermektedir. Bu etki esansiyel yağların sahip olduğu halkalı terpenlerin varlığı ve fenolik hidroksilik grubun bazı enzimlerle etkileşimi ile meydana gelmektedir. Ayrıca aktif terpenler, aldehitler, esterler ve alkoller esansiyel yağların antimikrobiyal etkisine katkı sağlamaktadır (Juven ve ark., 1994).

Turunçgil esansiyel yağları, meyve kabuğunda bulunan renkli kısım veya flavedo tabakasındaki küçük keseciklerden elde edilmektedir. Turunçgil yağları, terpenler, oksijenlenmiş ve uçucu olmayan bileşikleri içeren 100'den fazla bileşiğin karışımından oluşmaktadır (Sousa ve ark., 2004).

Turunçgil esansiyel yağları olarak bilinen maddelerin büyük bir kısmını yaklaşık olarak %90'dan fazlasını D-limonen oluşturmaktadır. D-limonen, doğada bulunan en yaygın terpenlerden biridir. D-limonenin meyve suyu, dondurma, puding ve içeceklerde aroma maddesi olarak kullanımının güvenli olduğu bildirilmiştir (Sun, 2007). Molekül formülü $C_{10}H_{16}$, kaynama noktası $176^{\circ}C$ ve molekül ağırlığı 136.23 g/mol'dür (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. D-limonen'in kimyasal yapısı

Biyolojik olarak aktif sekonder metabolitlerin ayrılması, tanımlanması ve karakterize edilmesi uygun bir ekstraksiyon metodu ile gerçekleşmektedir. Bitkisel materyal ve ekstrakte edilecek sekonder metabolitlere göre ekstraksiyon metotları da değişmektedir. Konvansiyonel ve konvansiyonel olmayan ekstraksiyon yöntemleri olmak üzere iki ana başlık altında incelemek mümkündür (Azmir ve ark., 2013).

1.2. Sekonder Metabolit Ekstraksiyon Yöntemleri

1.2.1. Konvansiyonel Ekstraksiyon Teknikleri

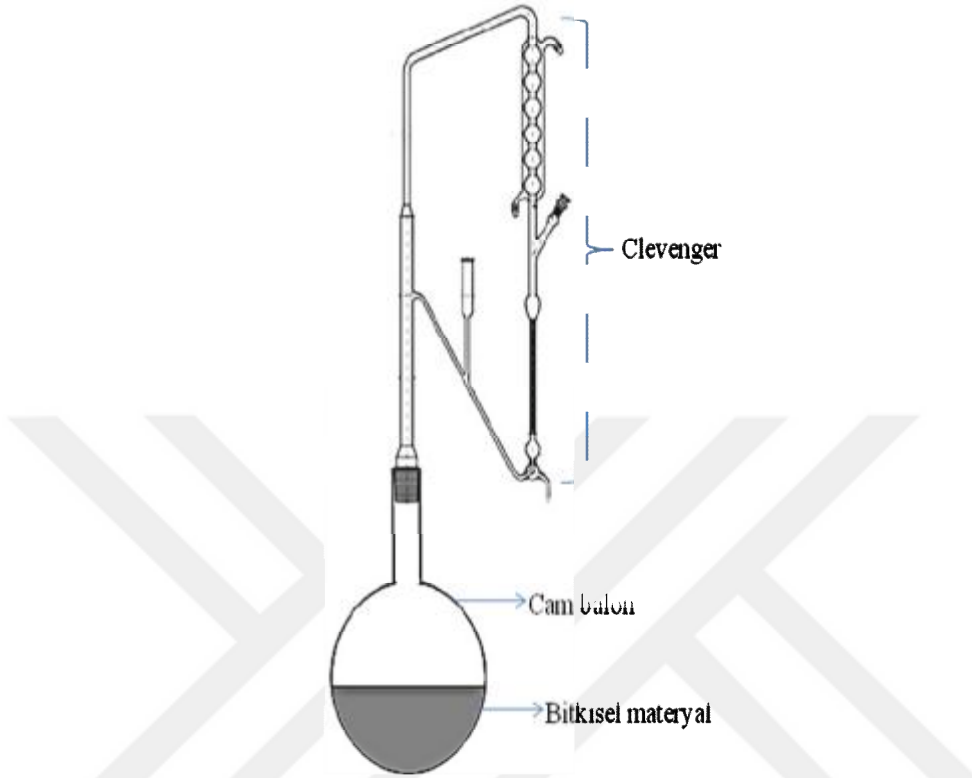
Bitkisel materyallerden sekonder metabolitlerin ekstraksiyonu için birçok teknik kullanılmaktadır. Bunlar genel olarak uygulanan sıcaklık ve çözücülere dayalı tekniklerdir. Sıklıkla kullanılan konvansiyonel ekstraksiyon metotları: 1. Sokslet ekstraksiyonu, 2. Hidrodistilasyon ve 3. Meserasyondur (Azmir ve ark., 2013).

Soxhlet ekstraksiyonu, 1879 yılında Alman kimyager Franz Ritter Von Soxhlet tarafından geliştirilmiştir. Önceleri katı bitkisel materyallerden yağ elde

etmek için geliştirilmiş olsa da günümüzde yoğun kullanım alanları bulunmaktadır. Genellikle yeni ekstraksiyon metotlarının karşılaştırılması için model bir metot olarak kullanılmaktadır (Soxhlet, 1879).

Maserasyon, ev yapımı toniklerin hazırlanmasında uzun zamandır kullanılmaktadır. Esansiyel yağ veya diğer metabolitlerin elde edilmesinde hem ucuz hem de popüler bir yöntemdir. Yöntemin ana basamakları öğütülmüş katı numunelerin uygun çözücüler ile karıştırılıp bir süre sonra süzülmesine dayanmaktadır.

Hidrodistilasyon, özellikle esansiyel yağların elde edilmesi için kullanılan geleneksel bir yöntemdir. Organik çözücüler kullanılmadan gerçekleştirilen yöntem, su distilasyonu, buhar distilasyonu, su ve buhar distilasyonu, vakum distilasyonu olmak üzere farklı şekillerde uygulanmaktadır (Vankar, 2004). Bunlardan su distilasyonu (Hidrodistilasyon), ekonomik olarak güvenli ve uygulanabilir olduğundan beri esansiyel yağ eldesinde kullanılan en yaygın ve en eski yöntem olmuştur. Yöntem, Clevenger tipi aparatlar ile gerçekleştirilmekte ve yağ yüzdesinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Şekil 1.5). Hidrodistilasyon yöntemi, hidrodüksiyon, hidroliz ve ısı ile ayrışma olmak üzere üç temel fizyokimyasal süreci içermektedir.



Şekil 1.5. Hidrodistilasyon çalışmalarında kullanılan clevenger aparatı (Bicchi ve Maffei, 2012)

1.2.2. Konvansiyonel Olmayan Ekstraksiyon Teknikleri

Uzun ekstraksiyon süreleri, pahalı ve yüksek saflıkta solvent gereksinimi, önemli ölçüde solventin buharlaştırılması, çoğu bileşiğin sıcaklık altında bozulması konvansiyonel yöntemlerin önemli kısıtlamaları arasındadır (Luque de Castro ve Garcia-Ayuso, 1998). Konvansiyonel olmayan ekstraksiyon teknikleri tüm bu olumsuzlukların aşılması için umut vadetmektedir. Bu tekniklerden bazıları, ultrason destekli ekstraksiyon, enzim destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon, süperkritik akışkan ekstraksiyonu ve basınçlı sıvı ekstraksiyonudur. Ultrason destekli ekstraksiyonda insan işitmesinin ötesinde bir ses dalgası kullanılmaktadır. Ultrasonla yapılan ekstraksiyon yöntemi iki fiziksel olayı içermektedir; 1. Hücre duvarı boyunca difüzyon ve 2. Hücre duvarı kırıldıktan

sonra hücre içeriğinin sudan geçirilmesidir. Enzim destekli ekstraksiyon eser miktardaki bileşiklerin izole edilmesi ve verimin artırılması için kullanılan etkin bir seçenek olarak kabul edilmektedir (Rosenthal ve ark. 1996). Ekstraksiyonlar sırasında selüloz, α -amilaz, pektinaz gibi spesifik enzimlerin eklenmesi, hücre duvarının kırılması ve lipit ile polisakkarilerin hidrolizini sağlayarak ekstraksiyon gücünü artırmaktadır (Singh ve ark., 1999; Rosenthal ve ark., 1996). Enzim destekli ekstraksiyon yönteminde iki yaklaşım vardır: 1. Enzim destekli sulu ekstraksiyon [enzyme-assisted aqueous extraction (EAAE)] ve 2. Enzim destekli soğuk presleme [enzyme-assisted cold pressing (EACP)] yöntemleridir (Latif ve Anwar, 2009). EAAE yöntemi genellikle tohumlardan yağ izolasyonu için geliştirilmiştir (Rosenthal ve ark., 1996, 2001; Hanmoungjai ve ark., 2001; Sharma ve ark., 2002). EACP yönteminde ise enzimler tohum hücre duvarını hidroliz etmek için kullanılmaktadır (Concha ve ark., 2004). Mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi, 300 MHz ile 300 GHz frekansı aralığında elektromanyetik alanlarda mikrodalga enerjisi kullanılarak uygulanmaktadır (Paré ve ark., 1994).

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu 1870 yılında Hannay and Hogarth tarafından keşfedilmiştir. Yöntem, birçok alanda (çevre, gıda, polimer uygulamaları gibi) başarılı bir şekilde uygulanmış ve hala tercih edilmektedir. Özellikle ilk olarak kahvenin dekafeinizasyonunda kullanıldığı bildirilmiştir (Zosel, 1964; Hannay ve Hogarth, 1879; Zougagh ve ark., 2004). Süperkritik durum ayırt edici bir hal olup, bir madde kritik noktasının ötesinde basınç ve sıcaklık altında tutulursa erişilebilir. Bir madde sahip olduğu kritik basınç ve sıcak değerinin üzerine getirilirse bu madde süperkritik akışkan olarak adlandırılmaktadır. Bu duruma sahip bir madde ne sıvı ne de gaz formdadır. Süperkritik akışkanlar, gaz benzeri difüzyon, viskozite, yüzey gerilimi özellikleri ile sıvı benzeri yoğunluk ve çözünme gücüne sahiptir. Bu özellikleri sebebi ile daha kısa sürede daha verimli ekstraksiyon sağlamaktadır (Sihvonen ve ark., 1999).

Ekstraksiyon metotları, sekonder metabolit elde edilmesinde önemli bir yere sahiptir. Ancak sekonder metabolitlerin istenilen özellikte veya saflıkta

üretilebilmesi için bitkisel materyalin kalite ve miktarı daha da önem kazanmaktadır. Bitki sekonder metabolitlerin elde edilmesi için kullanılan materyaller, çoğunlukla doğal yetiştirme alanlarından toplanan bitkilerden elde edilmektedir. Bitkiler yetiştirildikleri ekolojik alanlardan olumlu yada olumsuz olarak etkilendiği için kontrollü bir üretim sağlanamamaktadır. Bu nedenle günümüzde daha kontrollü bitkisel ürün ve sekonder metabolit üretimleri için bitki biyoteknolojisi alanındaki gelişmelerden faydalanılmaktadır.

1.3. Sekonder Metabolitlerin Biyoteknolojik Üretim Yöntemi

1.3.1. Bitki Doku Kültürü

Doku kültürü, sürgün, yaprak, kök, gövde ve diğer bitki kısımlarından alınan bitki parçacıklarının (eksplant), aseptik ve kontrollü ortam şartlarında, bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak, yeni bitki kısımlarının veya yeni bitkisel ürünlerin geliştirilmesi olarak tanımlanmaktadır (Babaoğlu ve ark., 2001; Dagla, 2012). Bitki doku kültürlerinin, kontrollü şartlar altında yapılması, iklimsel değişikliklerden ve toprak şartlarından bağımsız olması ve aseptik şartlarda yapılması, bu tekniğin kullanımını daha da etkili hale getirmiştir.

Bitkisel gen kaynaklarının muhafazası, yeni çeşitlerin geliştirilmesi, bitkilerin klonal çoğaltılmasında, hastalıklardan arı bitki üretimi, sekonder metabolitlerin üretiminde bitki doku kültürü çalışmalarının önemli bir yeri vardır. Sürgün, kök, embriyo, hücre süspansiyon ve kallus kültürü çalışmaları başlıca doku kültürü yöntemleri arasında sayılabilmektedir. Bu yöntemler içerisinde sekonder metabolit üretimi için daha çok kallus kültürü kullanılmaktadır. Kallus kültürü, bitkisel materyallerden elde edilen ve bölünme yeteneğini kaybetmemiş doku parçacıklarının uygun karbon kaynağı ve bitki büyüme düzenleyicileri bulunan ortamlarda büyütülmesidir. Bu ortamlarda gelişen kalluslar morfolojik olarak düzensiz kütlelerdir. Kallus kültürüne ek olarak süspansiyon kültürlerinin de sekonder metabolit üretiminde oldukça önemli bir yeri vardır. Süspansiyon kültürler için sıvı besi ortamı ile önceden geliştirilmiş kalluslar ve sürekli

çalkalamalı bir sistem kullanılmaktadır. Süspansiyon ve kallus kültürleri kullanılarak üretilen birçok sekonder metabolit vardır. Bunlardan bazıları Çizelge 1.3'te verilmiştir.

Çizelge 1.3. Farklı sekonder metabolitlerin *in vitro* üretimi

Bitki	Aktif Bileşen	Kültür Tipi	Referans
<i>Agave amaniensis</i>	Saponin	Kallus	Andrijany ve ark., 1999
<i>Ailanthus altissima</i>	Alkaloid	Süspansiyon	Anderson ve ark., 1987
<i>Allium sativum</i>	Allin	Kallus	Malpathak ve David, 1986
<i>Ambrosia tenuifolia</i>	Altamisin	Kallus	Goleniowski ve Trippi, 1999
<i>Anchusa officinalis</i>	Rosmarinik asit	Süspansiyon	De-Eknamkul ve Ellis, 1985
<i>Ammi majus</i>	Triterpenoid	Süspansiyon	Staniszewska ve ark., 2003
<i>Artemisia annua</i>	Artemisinin	Kallus	Baldi ve Dixit, 2008
<i>Aspidosperma ramiflorum</i>	Ramiflorin	Kallus	Olivira ve ark., 2001
<i>Catharanthus roseus</i>	Indol alkaloid	Süspansiyon	Tallevi ve Dicosmo, 1988
<i>Citrus</i> sp.	Limonin	Kallus	Barthe ve ark., 1987

Çizelge 1.3'ün devamı.

Bitki	Aktif Bileşen	Kültür Tipi	Referans
<i>Citrus</i> sp.	Naringin	Kallus	Barthe ve ark., 1987
<i>Corydalis ophiocarpa</i>	Alkaloid	Kallus	Iwasa ve Takao, 1982
<i>Hyssopus officinalis</i>	Sterol	Süspansiyon	Skrzypek ve Wysokinsu, 2003
<i>Rheum ribes</i>	Kateşin	Kallus	Farzami ve Ghorbani, 2005
<i>Vitis vinifera</i>	Antosiyanin	Süspansiyon	Qu ve ark., 2006
<i>Tinospora cordifolia</i>	Berberin	Süspansiyon	Rama Rao ve ark., 2008
<i>Withania somnifera</i>	Steroidallakton	Kallus	Mirjalili ve ark., 2009
<i>Gymnema sylvestre</i>	Gimnemik Asit	Kallus	Gopi ve Vatsala, 2006

1.4. Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri

Son yıllarda biyoteknolojik çalışmalardaki gelişmeler bitki doku kültürleri, bitki genetik mühendisliği yanında bitki ve meyve kalitesini etkileyen genlerin moleküler mekanizmasının anlaşılması için de önemli faydalar sağlamış ve bu tür çalışmalar bir çok araştırmacının ilgisini çekmiştir (Kato ve ark., 2004; Xu ve Deng, 2002). Bu amaç ile 1977 yılında, DNA dizi analizine dayalı iki yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler; Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi ve Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemidir (Maxam ve ark., 1977; Sanger ve ark., 1977).

Hibridizasyon ya da sekansa dayalı yaklaşımları içeren yeni nesil teknolojilerin geliştirilmesiyle başta insan olmak üzere bitki, hayvan ve mikroorganizmaların tüm dizilerinin çıkartılması mümkün hale gelmiştir (Wang ve ark., 2009). En sık kullanılan dizileme yöntemi olan Sanger yöntemine dayalı olarak otomatik dizileme cihazlarının kullanımı yaygınlaşmış ve İnsan Genom

Projesi (1988) ile yeni nesil dizileme teknolojileri ortaya çıkmıştır. Sanger yönteminin maliyetli ve teknolojik olarak kısıtlı olması sebebi ile bitki biyoteknolojisi çalışmalarında yetersiz olduğu görülmüştür. Karmaşık ve büyük genoma sahip bitkilerde yeni nesil dizileme, uzun ve doğruluk oranı yüksek okumalarla başarılı bir veri kalitesi sunmaktadır. Aynı zamanda uygun hız ve maliyet avantajları sebebiyle de yeni nesil dizileme bitki biyoteknolojisi çalışmalarında oldukça fazla tercih edilmektedir (Weber ve ark., 2007, Novaes ve ark., 2008).

Yeni nesil dizileme yöntemlerinin geliştirilmesi hem transkriptomların belirlenmesi hem de haritalanması için yeni bir yöntem sağlamıştır. Özellikle RNA-Seq (RNA dizilemesi) olarak adlandırılan yöntemin mevcut yaklaşımlara kıyasla belirgin avantajlara sahip olduğu ve ökaryotik transkriptomların analizinde köklü değişiklikler yapabileceği ortaya konmuştur. Bu teknik son yıllarda ileri düzey transkriptom sekanslama tekniği olarak geliştirilmiştir (Wang ve ark., 2009).

Günümüzde pek çok platform yeni nesil dizileme teknolojilerinde kullanılmaktadır. Bunlar arasında en bilinenleri; Illumina Miseq/Hiseq/GA baz sentezine dayalı dizileme, Roche 454 prolizleme yöntemi ve Solid Sistemi ligasyon yoluyla dizileme yöntemleri sayılabilir. Yeni nesil dizileme çalışmalarında kullanılan sistemler ise, Applied BioSystem SOLiD, Roche 454 genome analyzer, Illumina Genome Analyzer, Complete Genomics, Helios, Pacific Biosciences ve Ion Torrent sistemleridir (Ustek ve ark., 2011; Quail ve ark., 2012; Sarıman M., 2013; Mutz ve ark., 2013). Bunlar arasında senteze dayalı sekanslama prensibine sahip Illumina platformları yeni nesil dizileme teknolojileri arasında bitkilerde en fazla kullanılan platformdur.

Bu çalışmada, farklı turuncgil tür ve çeşitlerine ait farklı dokulardan (meyve kesiti ve kabuklar) biyoteknolojik ve klasik yöntemler kullanılarak bazı sekonder metabolitlerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Klasik yöntemler kullanılarak meyve kabuklarından esansiyel yağlar elde edilip kimyasal bileşenleri araştırılmıştır. Biyoteknolojik yöntemlerden kallus ve hücre süspansiyon kültürü ile

seçili meyveler kullanılarak sekonder metabolitlerin üretilmesi ve elisitör uygulamasının sekonder metabolitler üzerindeki etkisinin anlaşılması hedeflenmiştir. Ayrıca sekonder metabolitlerin üretim mekanizmasında rol oynayan genlerin Illumina platformu kullanılarak RNA-Seq analizleri ile belirlenmesi amaçlanmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Sekonder Metabolitlerin Klasik Yöntemlerle Eldesi İle İlgili Yürütülen Çalışmalar

Yusof ve ark. (1990) çalışmalarında farklı turuncgil meyvelerine ait dokularda naringin içeriğini araştırmışlardır. Analizleri HPLC metodu kullanarak gerçekleştirmişler ve en yüksek naringin içeriğinin meyve kabuğunda bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Castillo ve ark. (1991), turunc yaprak, çiçek ve meyvelerinin gelişmesi sırasında neohesperidin ve naringin miktarını araştırmışlardır. Genel olarak neohesperidin miktarının naringine göre daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Naringin miktarı çiçekte 4.46 $\mu\text{mol/g}$ ve yaprakta 3.83 $\mu\text{mol/g}$ olmasına karşın 25 mm çapındaki meyvede 49.39 $\mu\text{mol/g}$ ile 10 mm çapındaki meyvede de 56.07 $\mu\text{mol/g}$ olarak tespit etmişlerdir. Hesaplamaları taze ağırlık üzerinden yapmışlardır.

Lota ve ark. (2001) çalışmalarında 15 mandarin çeşidine ait yaprak ve kabuk esansiyel yağlarının kimyasal bileşimlerini incelemişlerdir. Farklı 15 çeşide ait toplam 58 yaprak ve kabuk yağı, aynı şartlara sahip mandarin ağaçlarından toplanan meyve ve yapraklardan elde etmişlerdir. Kimyasal bileşimlerini GC, GC-MS ve ^{13}C NMR kullanarak belirlemişlerdir. Mandarin kabuklarında limonen, g -terpinen ve linal asetat; mandarin yapraklarında ise sabinen, γ -terpinen/linalol ve metil N -Metil antranilat'ın en fazla bulunan bileşenler olduklarını belirlemişlerdir. Tüm çeşitlerde D-limonenin yaygın olduğunu belirtmişlerdir.

Vekiari ve ark. (2002), yaptıkları çalışmada bir limon çeşidine ait kabuk ve yapraklardan esansiyel yağları izole ederek mevsimsel değişimlerini gözlemlemişlerdir. Girit Zambetakis (*C. limon*) kabuğundan ve yapraklarından esansiyel yağları Clevenger cihazı kullanılarak buhar distilasyonu ile elde etmişlerdir. Uçucu yağlar GC-MS analizine tabi tutularak 35 bileşen tespit edilmiştir. Hem kabuk hem de yapraklardan elde edilen yağların temel bileşenin D-limonen olduğu tespit edilmiştir. Yaprak yağında α -pinen, mirsen, neral, geranial,

neril asetat, geranil asetat ve β -karyofilen bileşenleri belirlenmiştir. Uçucu bileşenlerin miktarı oktil asetat kullanılan internal standart metod üzerine dayanmakta ve her kg esansiyel yağ miktarı başına mg olarak tanımlanmıştır. Yüksek miktarda neral ve genarial miktarı her iki esansiyel yağın yüksek kalitede elde edildiğinin bir göstergesi olmuştur. Aroma profili ve uçucu yağ bileşenleri arasındaki kantitatif farklar bir yıldan fazla bir sürede altı değişik zaman diliminde ölçülmüştür. Limon yaprakları ve kabuğu bileşenleri arasındaki farklar belirlenmiştir. Kasım ayı örneklerinde cis ve trans izositral içeriğinin daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Atti-Santos ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada misket limondan (*Citrus latifolia* Tanaka) hidrodistilasyon ve süperkritik akışkan yöntemiyle esansiyel yağlar elde etmişlerdir. Hidrodistilasyon durumunda değerlendirdikleri parametreler bitki materyalinin karakteristik özellikleri ve ekstraksiyon zamanı olmuştur. Süperkritik ekstraksiyonda ise sıcaklık, basınç, ekstraksiyon süresi, CO₂ akışı ve materyal özellikleri değerlendirilmiştir. Hidrodistilasyon için en iyi sonuçlar kabuğun 3 saatlik ekstraksiyonundan elde edilmiştir. Süperkritik ekstraksiyonda ise en iyi sonuçlar 90 bar basınçta 40°C'de, 1 ml/dk akış hızında 30 dk ekstraksiyon sürecinde elde edilmiştir. Misket limon yağı, öğütülmüş kabuktan verimli bir şekilde hidrodistilasyon (%5.45 w/w) ve süperkritik akışkan (%7.93 w/w) yöntemleri ile elde edilmiştir.

Ahmad ve ark. (2006), dört farklı turunçgile ait esansiyel yağları incelemişlerdir. Mousami (*C. sinensis*), Malta (*C. sinensis*), Altıntop (*C. paradisi*) ve Eureka limon (*C. limon*) çeşitlerine ait kabuklardan esansiyel yağları soğuk presleme metodu ile elde etmişlerdir. En yüksek yağ verimini %1.21 ile Malta çeşidi kabuklarında gözlemlemişler ve bunu sırası ile Eureka limon (%1.12), Mousami (%0.98) ve Altıntop (%0.73) izlemiştir. Esansiyel yağ analizleri Carbomax 10 M ile dolu GC/FID ile gerçekleştirilmiştir. Malta portakalı kabuk yağında gözlemledikleri temel bileşenler, limonen (%61.08), α -thujene (%0.11), α -pinene (%0.84), camphene (%0.32), citronellol (%4.18), citral (%7.74),

capraldehyde (%5.62), caprinaldehyde (2.10%), borneol (%7.63), α -terpinolene (%2.06), linalool (%1.28) ve citranelyl acetate (%0.22)'dir. Çalışmada kullanılan meyve kabuklarına ait esansiyel yağların sahip oldukları kimyasal bileşikler arasında nicel ve nitel farklılıklar gözlemlemişlerdir. Bu durumun çeşitlilik ve genetik yapıdan kaynaklanabileceğini öne sürmüşlerdir.

Gorinstein ve ark. (2006) yapmış oldukları çalışmalarında turuncğil meyvelerinin (portakal, altıntop gibi) dimetil sülfoksit (DMSO) ekstraktlarında naringin ve hesperidin miktarını, %2'lik asetik asit ve asetonitril taşıyıcı fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanılarak analiz etmişlerdir. Çalışmalarını 285 nm dalga boyunda gerçekleştirmişlerdir. DMSO ekstraktlarının 285 nm'de HPLC kromatogramları elde edilmiş ve bu çalışmada naringin (32.76 dk) ve hesperidin (33.2 dk) tutulma sürelerinin diğer yapılan çalışmalarla benzer olduğu tespit edilmiştir. HPLC'de farklı koşullar kullanılarak örneklerde naringinin (100 g örnek başına 52.5 ± 3.5 , 49 ± 3 ve 54.1 ± 2.9 mg) ve hesperidinin (44.1 ± 3.7) miktarlarını bulmuşlardır.

Green ve ark. (2007), Jamaika ve Meksika'da yetiştirilen bazı turuncğil türlerinin kabuğunda bulunan polimetoksi flavonların (PMFs) miktarlarını belirlemişlerdir. PMF'leri güneşte kurutulmuş turuncğil kabuklarından metanol ile ekstrakte etmişlerdir. Analizleri ters-faz HPLC ve UV dedektörü ile gerçekleştirmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar bütün turuncğil türlerinin 6 temel PMF'lerden en az üçünü içerdiğini göstermiştir. Ortanique kabuğunun en fazla PMF ($34,393 \pm 272$ ppm) içerdiğini tespit etmişler ve bunu tangerin ($28,389 \pm 343$ ppm) ile Meksika portakalının (örnek 1; $21,627 \pm 494$ ppm) takip ettiğini bulmuşlardır. Toplam 20 turuncğil kültüründe mevcut olan temel PMF'lerin; sinensetin, nobiletin, tangeretin, heptametoksiflavon, tetrametilskutellarin ve hakzametil-o-quersetagetin miktarlarını belirlemişlerdir. Elde ettikleri sonuçları Florida turuncğil kabuklarıyla kıyaslamışlardır. Meksika portakalının Jamaika çeşitlerinden daha fazla PMF içerdiğini tespit etmişlerdir. Bu durumun coğrafik faktörlerle ilgili olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Mandalari ve ark. (2007), bergamot kabuklarından ekstrakte edilen flavonoidlerin antimikrobiyal özelliklerini araştırmışlardır. Bergamot'un etanolik fraksiyonlarının aktivitelerini gram negatif bakteriler (*Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella enterica*), gram pozitif bakteriler (*Listeria innocua*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus lactis*) ve bir maya olan *Saccharomyces cerevisiae*'ye karşı test etmişlerdir. Bergamot fraksiyonlarının test edilen tüm gram negatif bakterilere karşı etkili oldukları bulunmuş ve bu fraksiyonların antimikrobiyal etkilerinin enzimatik deglikolizyondan sonra arttığı gözlemlenmiştir. Fraksiyonlar ve saf flavonoidlerin [neohesperidin, hesperitin (aglikon), neoeriodictin, eriodictiol (aglikon), naringin ve naringenin (aglikon)] minimum inhibe edici konsantrasyonlarını 200 µg/ml ile 800 µg/ml arasında bulmuşlardır. Eriodictiol, naringenin ve hesperetin ikili kombinasyonlarının test organizmalar üzerinde sinerjik etki gösterdiklerini tespit etmişlerdir. Sonuç olarak bergamot kabuğunun gram negatif bakterilere karşı etkili bir doğal antimikrobiyal kaynak olduğunu belirlemişlerdir.

Gürsoy ve ark. (2010) yapmış oldukları çalışmalarında *Citrus nobilis* kabuk yağının kimyasal bileşenlerini ve antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. Gaz kromatografi (GC) analizi ile elde edilen toplam yağın % 99.1'lik kısmını tanımlayarak 14 bileşen belirlenmiştir. Elde edilen yağın temel bileşeninin limonen olduğunu bulmuşlardır (% 76.8-GC ve % 86.2-FID). Esansiyel yağları, 4 tanımlayıcı test sistemleri sırasıyla beta karoten/linoleik asit, indirgeyici etki, DPPH radikal temizleme ve metal şelat oluşumu aktivitesi kullanılarak antioksidan aktivitesini değerlendirmişlerdir. Esansiyel yağların antioksidan özelliklerini umut verici olarak bulmuşlardır.

Hosni ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada, aynı koşullarda yetiştirilen 4 turuncu türünden esansiyel yağları izole edip, gaz kromatografisi (GC) ve gaz kromatografisi-kütle spektrofotometrisi (GC-MS) ile analiz etmişlerdir. Yağ verimini (w/w) Şadok (*C. grandis* Osbeck) için %1.06 ve mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) için %4.62 olarak belirlemişlerdir. Kalitatif ve kantitatif

analizler ile tüm yağ örneklerinde 70 bileşenin tanımlanmasını sağlamışlardır. Analiz edilen yağların ağırlıklı olarak monoterpen hidrokarbonlardan (%97.59-99.3) oluştuğunu gözlemlemişler ve esas olarak limonen (%92.52-97.3) ile β -pinene (%1.37-1.87) bileşiklerine sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Çeşitler arasında gözlemlenen kimyasal değişkenliklerin genetik farklılıklardan kaynaklanabileceğini öne sürmüşlerdir.

Nautiyal ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada süperkritik kabondioksit ekstraksiyon (SC-CO₂) ve hidrodistilasyon yöntemlerini kullanarak elde ettikleri portakal kabuğu yağını karşılaştırmışlardır. SC-CO₂ metodu kullanılarak elde edilen yağın miktarı, kalitesi ve bileşenleri araştırılmıştır. Ekstraksiyon için 28-60 °C arasında değişen sıcaklık ve 8-15 MPa arasındaki basınç parametreleri kullanılmıştır. Kalitenin belirlenmesi için yağ, GC ve kapiler GC yöntemiyle analiz edilmiştir. Süper kritik kabondioksit, yağdan tüm düşük uçucu fraksiyonları elde etmek için kullanılmış ve yağ veriminin ağırlıkça %3.42-3.99 aralığında olduğunu tespit etmişlerdir. Elde edilen yağın rengini ise soluk açık sarı olduğunu gözlemlemişlerdir. Yağın raf ömrünün geleneksel metotlarla elde edilen ekstrelerden daha uzun sürdüğünü bulmuşlardır.

Azam ve ark. (2013) yapmış oldukları çalışmalarında farklı turuncgil türlerinin genç ve olgun yapraklardan elde edilen temel uçucu bileşenleri headspace-katı faz mikroekstraksiyon (HS-SPME)-GC-MS yöntemini kullanarak analiz etmişlerdir. Dokuz turuncgil çeşidinden 9 adet aldehit, 19 monoterpen hidrokarbon, 27 oksijenli monoterpenler, 43 sesquiterpen hidrokarbonlar, 8 oksijenli sesquiterpenler, iki keton, 6 ester ve 9'u muhtelif bileşik olmak üzere toplamda 123 bileşeni tespit etmişlerdir. Çoğu kültürlerde genç yaprakların olgun yaprakların içerdiği bileşenlerden daha yüksek miktarda uçucu bileşen içerdiğini bulmuşlardır. Yaprak gelişimi sürecinde oksijenli monoterpenler ve sesquiterpen bileşenlerinde sayısının azalmasına karşın aldehit ve monoterpen hidrokarbonların yüzdesinin arttığını bulmuşlardır. Olgun yapraklarda limonenin ana bileşen olduğu gözlemlenirken genç yapraklarda en bol miktarda bulunan bileşenin linanol

olduğunu tespit etmişlerdir. Çoğu kültürlerde yaprak gelişimi boyunca limonen miktarının arttığı tespit edilirken linalol miktarının azaldığını bulmuşlardır. Yaprak uçucu bileşenlerinin aynı zamanda genetik farklılıklardan etkilendiğini belirlemişlerdir. Bir veya birkaç genotipte oldukça fazla bulunan bileşiğin diğerlerinde olmayabileceğini öne sürmüşlerdir. Satsuma mandarinin aksine genç limon yapraklarında limonenin ve diğer dört genotipe karşın üç genotipe ait olgun yapraklarda β -terpinenin varlığını tespit etmişlerdir. Düzenli verilerle çok değişkenli istatistik analizleri yapmışlar ve yaprak uçucu bileşenlerindeki değişimlerin belirlenmesi ile 6 grupta sınıflandırmışlardır. Farklı turuncgil çeşitleriyle yaprak evrelerinden elde edilen temel uçucu bileşenler arasındaki ilişkiyi belirlemek için yaptıkları bu çalışmanın endüstriyel amaçlı kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Pingret ve ark. (2014), hidrodistilasyon ekstraksiyonunu geliştirmek için ultrason teknolojisini kullanan yeni bir proses tasarlamış ve geliştirmişlerdir. Yöntemde ultrasonik bir prob kullanmışlardır. Geleneksel Clevenger ekstraksiyonu ile portakal kabuklarına ait esansiyel yağların ekstraksiyonunu fizikokimyasal karakterizasyon ve gravimetrik analizler kullanarak solo-Clevenger işlemi ile karşılaştırmışlardır. Hedef bileşiklerin kompozisyonlarına zarar vermeden geleneksel proses ile karşılaştırıldığında yeni yöntemde ekstraksiyon süresinin önemli ölçüde azaldığını gözlemlemişlerdir. Ultrason teknolojisine sahip solo-Clevenger işleminin geleneksel yöntemle göre daha hızlı olduğu ve benzer kalitede ekstraksiyon yaptığını tespit etmişlerdir.

2.2. Sekonder Metabolitlerin Biyoteknolojik Yöntemlerle Eldesi İle İlgili Yürütülen Çalışmalar

Bitkilere ait aktif bileşenlerin biyoteknolojik yöntemlerle üretilmesi ile ilgili oldukça fazla çalışma yapılmıştır. Turuncgillerin sahip olduğu birçok aktif bileşenin metabolik değişiklikleri ile ilgili olarak Endo ve ark. (2002) Fortunella ve turuncgiller üzerinde bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışmalarında, Fortunella ve bazı

turunçgil çeşitlerine ait embriyogenik hücreleri kullanarak süspansiyon kültürlerinde limonoid metabolizmasını incelemişlerdir. Limonoidlerin enstrümental analizleri için TLC, HPLC veya LC-MS'i kullanmışlardır. Nomilin içeren süspansiyon kültür ortamlarında 4 hafta boyunca kültüre alınan embriyogenik hücreler incelendiğinde çoğu türün nomilini obacunone ve limonine dönüştürdüğünü tespit etmişlerdir. Ayrıca, Fortunella ve Calamondin hücrelerinde kalamın grubu limonoidlerin üretildiğini ve *C. ichangensis* hücrelerinde de nomilinden deacetylnomilinin üretildiğini tespit etmişlerdir. Ek olarak araştırmacılar *C. aurantium*'daki embriyoit oluşumunun limonoid metabolizmasını etkilemediğini ileri sürmüşlerdir.

Pasqua ve ark. (2003) yapmış oldukları çalışmada, *H. perforatum* L.'nin *in vitro* rejenere kök ve sürgünleri, kallusları ve hücre süspansiyon kültürlerinden metanolik ekstraktlar elde etmişlerdir. Bu ekstraktlarda bulunan aktif metabolitlerin (hiperisin, hiperforin ve flavonoidler) *in vitro* kültürlerde üretilebilme yeteneklerini değerlendirmişlerdir. Çalışma sonunda hiperisinlerin, salgı yapılarının oluşumu ile ilgili olduğunu, ksantonların tüm kültürlerde temel metabolit olduklarını, flavonoid ve hiperforinlerin üretiminin de yaprak gelişimi ile ilgili olduklarını tespit etmişlerdir.

Martínez-Juárez ve ark. (2004), *Capsicum annuum*'un süspansiyon kültürlerini çalışmışlardır. Hem taze bitkide hem de bitkinin *in vitro* kültürlerinde bulunmayan 5,5-dikapsaisin bileşiğini elde etmişlerdir. Bu bileşiği sadece kapsaisin ile desteklenmiş süspansiyon kültürlerinden elde etmişlerdir.

Ahmad ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada, *Stevia rebaudiana*, *Citrus sinensis* ve *Saccharum officinarum*'un *in vitro* da gelişen dokularının antioksidan potansiyelini değerlendirmişlerdir. Etanol ile yaptıkları ekstraksiyonlarda *Stevia rebaudiana* kalluslarının en yüksek antioksidan aktivitesine (%87.7) sahip olduğunu bulmuşlardır. *C. sinensis* kallusunda antioksidan potansiyelini %51.8 olarak tespit etmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda *S. rebaudiana*'ya ait rejenere

dokuların *C. sinensis* ve *S. officinarum* dokularından daha fazla DPPH serbest radikalleri temizlediğini ve detoksifiye ettiği ortaya konulmuştur.

Xu ve ark. (2011) çalışmalarında, farklı turuncgil çeşitlerine ait kallus, yaprak ve meyve dokularında sentezlenen bazı karotenoidleri araştırmışlardır. Bitki çeşitlerine ve dokularına göre farklı miktarlarda karotenoid tespit etmişlerdir. En yüksek toplam karotenoidin yapraklarda olduğunu gözlemlemişlerdir. Tarocco kan portakalına ait kalluslarda luteinin ($2.34 \pm 0.13 \mu\text{g/g}$) en zengin karotenoid olduğunu ve Cara Cara portakalından elde edilen kalluslarda da en yüksek karotenoidin fiton ($29.08 \pm 1.17 \mu\text{g/g}$) olduğunu tespit etmişlerdir. Turuncgil kalluslarının spesifik karotenoid üretmek için kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Baque ve ark. (2012) süspansiyon hücre kültürü çalışmalarında fenolik, flavonoid ve antrakinon (AQ) üretimi üzerinde elisitörlerin etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarında *Morinda sitrifolia* (L.)'nın adventif kökleri kullanarak süspansiyon kültürlerde kitosan ve pektinin elisitör etkisini incelemişlerdir. Elisitör uygulamalarının sekonder metabolitlerin biyosentezini artırmasına karşın kök büyümesini engellediğini gözlemlemişlerdir. Elde edilen kuru ağırlık verilerine göre 103.16 mg/g AQ, 48.57 mg/g fenolik ve 75.32 mg/g flavonoid miktarı 0.2 mg/ml konsantrasyona sahip kitosan uygulamasında tespit etmişlerdir. Elisitör uygulamaları her ne kadar kök büyümesini olumsuz etkilese de %8 fenolik, %12 flavonoid ve %45 AQ miktarında artışa neden olduğu vurgulanmıştır.

Wee ve ark. (2013) *Sauropus androgynus*'un *in vitro* kültürlerinde elisitör uygulamasının sekonder metabolit üretimi ve antioksidan kapasitesinin geliştirilmesi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Aydınlik kültürlerde gelişen kalluslara uygulanan 200 μM MeJA'nın toplam fenolik madde miktarında 2.10 kat ve flavonoid miktarında ise 1.53 kat artış sağladığı bildirilmiştir. MeJA için en uygun konsantrasyonun bu çalışma için 200 μM olduğunu tespit etmişlerdir. Ek olarak MeJA uygulamasının (50-100 μM), 1.31 kat (%70.95) DPPH ve 1.19 kat (708.82 $\mu\text{g/g}$ FW) FRAP değerinde artışa neden olduğu belirlenmiştir. Elisitör uygulamasından 2 hafta sonra, somatik embriyolarda MeJA uygulamasının (50

μM) papaverin (8.31 kat artım, 5.57 $\mu\text{g/g}$ FW) ve kuarsetin (40.0 kat artım, 3.01 $\mu\text{g/g}$ FW)'de artışa neden olduğunu tespit etmişlerdir.

Jeyakani ve Rajalakshmi (2016) yapmış oldukları doku kültürü çalışmalarında *Melaleuca alternifolia*'nın polifenol içeriğini araştırmışlardır. Doku kültürü çalışmalarında tohum embriyolarını kullanmışlardır. Farklı konsantrasyonda kazein hidrolizat (1g/L, 2g/L, 3g/L) ve hindistan cevizi sütü (%1, %5, %10) uygulamasının polifenol birikimi üzerine etkisini incelemişlerdir. En iyi polifenol birikimini 2 g/L kazein hidrolizat ve %5 hindistan cevizi sütü uygulamasında tespit etmişlerdir. Her iki uygulama kendi arasında değerlendirildiğinde ise %5 hindistan cevizi sütünün daha etkili olduğunu gözlemlemişlerdir. Kallus gelişimi ve toplam polifenol miktarı açısından en iyi sürenin ise 63 gün olduğunu belirlemişlerdir.

Anjum ve ark. (2017) farmakolojik olarak önemli bir sekonder metabolit üreticisi olan *Linum usitatissimum* L.'nin (Keten) *in vitro* kallus kültürleri üzerinde çalışmışlar yapmışlardır. Keten'nin kallus kültürlerini kullanarak secoisolariciresinol diglucoside (SDG) ve lariciresinol diglucoside (LDG) gibi lignanlar ve dehydrodiconiferyl alcohol glucoside (DCG) ve guaiacylglycerol- β -coniferyl alcohol ether glucoside (GGCG) gibi neo-lignanların üretimi için etkili bir protokol geliştirmeye çalışmışlardır. Kallus kültürü çalışmalarında çeşitli konsantrasyonlarda α -naftalen asetik asit (NAA), thidiazuron (TDZ) ve 6-benzil adenin (BA) ile desteklenen Murashige ve Skoog (MS) ortamında kültüre alınmış gövde ve yaprak eksplantlarını kullanmışlardır. En yüksek toplam fenolik bileşik (111.09 mg/L) ve flavonoid (45.02 mg/L) miktarını gövdeden gelişen kalluslarda (1.0 mg/L NAA) elde etmelerine karşın, yapraktan gelişen kallusların (1.0 mg/L NAA) en yüksek antioksidan ve biyokütle (DW: 15.7 g/L) sahip olduğunu bulmuşlardır. Diğer tüm uygulamalara kıyasla optimum GGCG (3.8 ± 0.022 mg/g DW) birikiminin yapraktan gelişen kalluslarda (1.0 mg/L NAA) olduğunu HPLC analizleri ile ortaya koymuşlardır. Yine HPLC analizleri ile kökten gelişen kallusların (1.0 mg/L NAA) optimum SDG (2.7 ± 0.021 mg/g DW), LDG ($9.8 \pm$

0.062 mg/g DW) ve DCG (13.8 ± 0.076 mg/g DW) konsantrasyonlarına sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Yaptıkları uygulamalar içerisinde NAA'nın kallus kültüründe lignanlar ve neo-lignanların üretiminde farklılık gösterdiğine dair kesin kanıtlar elde etmişlerdir.

2.3. RNA-seq İle İlgili Yürütülen Çalışmalar

Moriguchi ve ark. (2002) satsuma mandarin'den (*C. unshiu* Marc.) flavanol sentazı (FLS) kodlayan bir cDNA klonunu (CitFLS) izole etmişler ve meyve olgunlaşması sırasında CitFLS RNA ifadesinin kararlı durumunu araştırmışlardır. CitFLS transkript seviyesinin genç yapraklarda yaşlı yapraklardan daha yüksek iken erken gelişme evresinde yüksek, olgunlaşma evresinde usarede düşük olduğunu gözlemlemişlerdir. Ek olarak kabukta CitFLS transkriptinin meyve olgunlaşması sırasında yüksek olduğu tespit edilmiştir. Satsuma mandarin CitFLS'nin, gelişim aşamasında ve dokuya spesifik bir şekilde düzenlendiği sonucu elde edilmiştir. Araştırmacılar, satsuma mandarine ait kabuk dokularında bir flavanol glikozid olan rutin üretiminin bu dokular da flavanol üretme kabiliyetinin varlığını ortaya koymuştur.

Yu ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada portakalda meyve gelişimi ve olgunlaşması sırasında transkriptom değişimlerini araştırmışlardır. Portakal çeşidi Anliu (WT) ve mutant Hong Anliu (MT) meyve posası transkriptomları, meyve olgunlaşması ve gelişimi sırasında ifade edilen genleri araştırmışlar ve karşılaştırmışlardır. WT ve MT'ye ait transkriptomlar İllumina dizileme platformu kullanılarak analiz edilmiştir. MT ve WT'de sırası ile 19.440 ve 18.829 gen tespit etmişlerdir. Genlerin %89'undan fazlası, WT'de meyve gelişimi ve olgunlaşması sırasında farklı seviyede ifade olmuştur. Farklı şekillerde ifade edilen genlerin fonksiyonel olarak sınıflandırılması, meyve gelişimi ve olgunlaşması sırasında ifade olan genlerin hücre duvarı biyosentezi, karbonhidrat ve sitrik asit metabolizması, karotenoid metabolizması ve strese yanıt ile ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Li ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada *Picea balfouriana* kallusunda somatik embriyogenezisi düzenleyen moleküler mekanizmayı anlamaya çalışmışlardır. Bu amaçla üç *Picea balfouriana* genotiplerine ait embriyojenik ve embriyojenik olmayan dokuların transkriptomlarını incelemek için RNA-seq teknolojisini kullanmışlardır. Dokularda toplam 55.078.846 nükleotid dizisi analiz etmişler ve bunların %49.56'sının *Picea abies* genomu veritabanındaki 26.437 genin 22.295'i (%84.3) ile iyi eşleştiğini bulmuşlardır. Embriyojenik olmayan dokulara kıyasla, embriyojenik dokularda, 431 upregüle ve 987 down regüle gen dâhil, 1.418 farklı şekilde eksprese edilen geni (yanlış bulgu oranı <0.0001) diferansiyel gen ekspresyon analizi ile tespit etmişlerdir. KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) yolak analizi ile bitki hormonu sinyal iletiminde, metabolik yollarda (nişasta ve sukroz metabolizması) ve fenilalanin metabolizmasında birçok genin yer aldığını ortaya koymuşlardır. Tespit ettikleri yolların somatik embriyogenezin başlatılmasına ilişkin mekanizmaların daha kapsamlı bir şekilde anlaşılmasına katkıda bulunacağını ileri sürmüşlerdir.

Bai ve ark. (2014) *Poncirus trifoliata* (L.) Raf köklerindeki fosfor (P) eksikliğine bağlı transkriptomik değişiklikleri yeni nesil RNA-Seq analizleri ile araştırmışlardır. Toplam 1135 genin P eksikliği yanıtında farklı şekilde ifade olduğu gösterilmiştir. Transkriptomik veriler, kantitatif real-time PCR ile doğrulanmıştır. Farklı şekillerde eksprese edilen 76 genin promotör bölgelerinde bir ya da daha fazla P-duyarlı cis-elementi (P1BS) tespit etmişlerdir. Ek olarak eksprese edilen genlerin 117'sinin P eksikliğinde bitkiye ait hormon sinyal regülasyonunda yer alan transkripsiyon ve taşıma faktörü genleri olduklarını tespit etmişler ve bu genlerin P eksikliği yanıtında önemli görevleri olduğunu ileri sürmüşlerdir. P eksikliği altında turunçgil ve *Arabidopsis* transkriptlerinin karşılaştırmalı analizleri sonucunda P metabolizması ile ilişkili 174 geni tanımlamışlardır.

Wei ve ark. (2015) çalışmalarında kirazın (*Prunus avium* L.) sarı ve kırmızı meyvelerinde antosiyanin biyosentezinde görev alan genlerin transkriptom

analizlerini yapmışlardır. Kırmızı ve sarı meyvelerden alınan cDNA kütüphaneleri yeni nesil Illumina/Solexa dizileme platformu ve *de novo* dizilemesi kullanılarak dizilenmişlerdir. Kombine bir toplama stratejisi kullanılarak 66 milyondan fazla yüksek okuma, 43.128 unigen içerisinde toplanmışlardır. Ardından toplam 22.452 unigen, veritabanı ile karşılaştırılmış ve bu unigenlerin 20.095'inin Nr (yinelenmeyen) protein veritabanında açıklandığını vurgulamışlardır. Meyve olgunlaşma aşamaları arasındaki transkriptom farklılıklarını Illumina platformunu kullanarak analiz etmişlerdir. Biyolojik yolak analizi ile 72 unigenin antosiyanin biyosentezi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Meyve olgunlaşması süresince fenilalanin amonyak liyaz (PAL), 4-kumarat-CoA ligaz (4CL), kalkon sentaz (CHS), kalkon izomeraz (CHI), flavanon 3-hidroksilaz (F3H), flavanon 3'-hidroksilaz dihidroflavonol 4-redüktaz (DFR), antosiyanidin sentaz (ANS) ve UDP glikoz: flavonol 3-O-glikoziltransferaz (UFGT) kodlayan genlerin ekspresyon ifadelerinin kırmızı ve sarı meyve arasında farklılık gösterdiğini belirlemişlerdir. Kantitatif real-time PCR (qRT-PCR) ile antosiyanin biyosentetik enzimlerini ve transkripsiyon faktörlerini kodlayan 18 unigenin değişen ifade seviyelerini doğrulamışlardır.

Flavonoidlerin ve fenilpropanoidlerin önemli sekonder metabolik yolları ile ilişkili aday genlerin belirlenmesi amacı ile Loke ve ark. (2017) *Polygonum minus* bitkisinde transkriptom analizleri gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar referans olarak birleştirilmiş bir transkriptom kütüphanesi oluşturmak için *Polygonum minus* bitkisinin kök ve yaprak dokularında Illumina sekanslama ve 454'ün okumalarını içeren hibrid bir sistem kullanmışlardır. Toplam 34.37 milyon filtrelenmiş ve normalleştirilmiş okumalar, toplam 136.67 Mbp uzunluğunda 188.735 transkript içinde toplanmıştır. Mevcut olan genom dizilerine karşılık benzerlik araştırmaları yapmışlar ve büyük bir kısmı *Arabidopsis thaliana*'dan (%58.9) olmak üzere *Polygonum minus* transkriptlerinin 163.200 (%86.5)'ü için benzerlik eşleşmelerini tespit etmişlerdir. Fenilpropanoidlerin ve flavonoidlerin biyosentezinde yer alan 7 seçilmiş transkript qRT-PCR ile doğrulanmıştır.

Araştırmacılar, tüm transkriptlerin sekonder metabolit biyosentezi ile ilgili transkript profillerinin çıkarılması için KEGG yollarını kullanmışlardır. Yaptıkları bu çalışmaların *Polygonaceae* familyasındaki sekonder metabolit biyosentezi üzerine moleküler genetik ve evrimsel araştırmalar için faydalı bir sekans kaynağı olarak hizmet edeceğini öne sürmüşlerdir.

Bitki sekonder metabolitlerinin yaygın bir grubu olan fenolik bileşikler içerisinde antosiyaninler hem insan sağlığı hem de bitkiler için oldukça önemli bir yere sahiptir. Özellikle birçok bitkide kırmızı rengin oluşmasında rol oynayan doğal bir pigmenttir. Birçok bitkide antosiyanin birikiminin altında yatan moleküler mekanizmalar hakkında çok az şey bilinmektedir. Fang ve ark. (2016) meyve olgunlaşması sırasında kırmızı meyve etine sahip Furongli erik çeşidindeki (*Prunus salicina* Lindl.) transkriptomik değişiklikleri analiz etmek için RNA-seq tekniğini kullanmışlardır. Yüksek kalite 161 milyonu aşkın okuma, 52.093 unigen içinde toplanmış ve bunların %49.4'u bilinen veritabanları kullanılarak açıklanmıştır. Bunlardan 25.681 unigenin NCBI Nr veritabanındaki dizilere, 7.203 unigenin Swiss-Prot veritabanında bilinen proteinlere ve 5816 ile 8585 unigenin sırasıyla KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) ve COG (Cluster of Orthologous Groups) veritabanlarındaki mevcut dizilerle önemli derecede benzerlikleri olduğunu bulmuşlardır. Meyve olgunlaşması süresince toplam 3548 unigenin farklı şekillerde ifade edildiğini ve bunların 119'unun da "diğer sekonder metabolitlerin biyosentezi" ile ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Biyolojik yolak analizi ve gen ontolojisi terim zenginleştirme analizine göre antosiyanin biyosentezinde farklı şekilde ifade edilen 13 genin rol aldığını ortaya koymuşlardır. Buna ek olarak antosiyanin biyosentezini kontrol edebilen MYB ve bHLH gibi transkripsiyon faktörlerini, yapısal genlerin ve transkripsiyon faktörlerinin ortak ekspresyon analizi ile tespit etmişlerdir.

Şimşek (2016) turuncgillerde nüseller embriyonu mekanizmasında rol oynayan genleri Illumina HiSeqTM 2000 kullanarak RNA-seq analizleri ile araştırmıştır. RNA-seq analizleri ile örnekler arasında toplam 42168870-44975770

temiz okuma elde etmiştir. GO analizlerine göre Orlando tangelo balon- Orlando tangelo 3. gün örneklerinde 2359 (1996 up regüle, 363 down regüle) ve Klemantin mandarini 3. gün-Orlando tangelo 3. gün örneklerinde ise 123 (1372 up regüle, 751 down regüle) farklı ifade olan gen belirlemiştir.

Gao ve ark. (2016) iki farklı *Phalaenopsis* orkide dokusuna ait transkriptomların *de novo* sekanslama ve karşılaştırmalı analizlerini gerçekleştirmiştir. Farklı renkteki *Phalaenopsis* bitkilerinde gen ekspresyon seviyelerini karşılaştırmak ve antosiyanin sentezi hakkında genomik bilgiyi elde etmek amacı ile bitki dokusuna özgü transkriptomları araştırmışlardır. Orkide çiçeklerinde antosiyanin sentetik yolağının ve eksprese edilen genlerin tespit edilmesini kolaylaştırmak amacı ile Illumina HiSeq™ 2000 platformunu kullanmışlardır. Illumina sekanslama teknolojisini kullanarak tomurcuklarda kırmızı *Phalaenopsis* için 888.749 ve sarı *Phalaenopsis* için ise 1.057.077 sekans elde etmişlerdir. *De novo* analizleri ile 51.771 unigen tespit etmişler ve okumalar sonucu farklı şekilde eksprese edilen 801 gen elde etmişlerdir. Kırmızı *Phalaenopsis* ile kıyaslandığında sarı *Phalaenopsis* tomurcuğunda 358 upregüle ve 443 down regüle gen tespit etmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Bitkisel Materyal

Tez kapsamında Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.), Klemantin mandarin (*Citrus clementina*), Meyer limonu (*Citrus meyeri*), İnterdonat limonu (*Citrus x limon* L. Burm.f.), Moro kan portakal (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) ve Turunç (*Citrus aurantium*) genotipleri sekonder metabolitlerin klasik yöntemlerle elde edilmesi için kullanılmıştır. Ayrıca Washington navel portakal (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) ve Star Ruby altıntop (*Citrus paradisi* Macfadyen) ise hem klasik hem de biyoteknolojik yöntemlerle sekonder metabolitlerin eldesinde kullanılmıştır.

3.1.1. Satsuma Mandarin (*C. unshiu* Marc.)

Satsuma, büyük olasılıkla 1600'lü yıllarda Çin'den Japonya'ya getirilen Tsao Chich mandarininden türetilmiştir. Ticari olarak öneme sahip turunçgiller içerisinde soğuğa en dirençli olanlarıdır (Hodgson, 1967).

3.1.2. Klemantin Mandarin (*Citrus clementina*)

Klemantin mandarininin yüzyıl önce Cezayir'de göz mutasyonu ile meydana geldiği ve papaz Clement tarafından bulunduğu düşünülen türler arası bir melezdir. O zamandan beri aşılama yolu ile vejetatif olarak çoğaltılmıştır (Ollitrault ve ark., 2012). Akdeniz havzası özellikle İspanya, Kuzey Afrika ve Güney Afrika'nın bir kısmında yetiştirilmektedir. İspanya ve Fas'ta en popüler mandarinlerdir (Kafa ve Canihoş, 2010).

3.1.3. Meyer Limonu (*Citrus meyeri*)

Meyer limonu, 1908 yılında Pekin'de ön bahçe bitkisi olarak ortaya çıkarılmış ve araştırmacı Frank Meyer'in adını almıştır. Tam bir limon olmadığı ve limon-portakal veya limon-mandarin melezi olduğu sanılmaktadır. Sağlam, canlı

ve soğuğa dayanıklı bir çeşittir. Meyve kabuğu pürüzsüz, sarı portakal renkli ve incedir. Kabukta limona özgü kabuk yağları aroması bulunmaz (Kafa ve Canıhoş, 2010; Lim, 2012).

3.1.4. İnterdonat Limonu (*Citrus x limon* L. Burm.f.)

İnterdonat limonu, Sicilya orjinli ve yaklaşık 1857 yılında ortaya çıkmıştır. Limon ile ağaç kavunu melezi olduğu kabul edilmektedir. Diğer limonlardan daha büyüktür. Meyve kabukları ise orta derece kalınlıktadır (Chaudhry ve ark., 2004).

3.1.5. Turunç (*Citrus aurantium*)

Kuzey doğu Hindistan ve güney doğu Çin ile kuzey Myanmar'ın birleştiği bölgelerden geldiğine inanılmaktadır (Chaudhry ve ark, 2004). Doğuya doğru Japonya'ya, batıya doğru Hindistan'a, Ortadoğu'ya ve oradan da yaklaşık 1000 yıl önce hızla Akdeniz de kurulan Avrupa'ya yayılmıştır (Chaudhry ve ark, 2004).

3.1.6. Washington Navel Portakalı (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)

Washington navel portakal, Brezilya'nın Bahai yöresinde Celesta portakal çeşidinden mutasyonla oluşmuştur. Washington Navel erkenci ve çekirdeksiz (partenokarp) bir çeşittir. Uygun bakım koşullarında düzenli verim veren orta sulu, tatlı ve aromalı meyvelere sahiptir. Çeşit, Güney Afrika, Fas, İspanya, Türkiye'de ticari öneme sahip ve dünyanın birçok bölgesinde yetiştiriciliği yapılmaktadır (Kafa ve Canıhoş, 2010).

3.1.7. Moro Kan Portakalı (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)

Kan portakalı Malta ve Sicilia adalarından gelen bir *Citrus sinensis* çeşididir. Akdeniz bölgelerinde özellikle İtalya, Fas, İspanya, Tunus, Kaliforniya ve Florida'da yetiştirilmektedir (Saunt, 1990; Mouly, 1997). Kan portakalları alışılmadık lezzetleri ve antosiyaninlerin etkisiyle usare ve bazen de kabuk dokularında oluşan kırmızı pigmentasyon ile ayırt edilmektedir (Lee ve ark., 1990).

Bilinen çoğu kan portakalı çeşidi, Doppio Sanguigno gibi eski İtalyan çeşitlerinden türetilmiştir. Ayrıca nispeten daha yakın zamanlarda türetilmiş Tarocco ve Moro çeşitlerini içerirken bu çeşitlere ait antosiyanin pigmentasyon seviyelerinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Butelli ve ark., 2012). Çeşitler içerisinde en renklisi Moro'dur ve uygun koşullarda kırmızı renk meyve etini tamamen kaplamaktadır (Remini ve ark., 2015).

3.1.8. Star Ruby Altıntop (*Citrus paradisi* Macfadyen)

Hudson çeşidinin ısınlaması yolu ile 1959 yılında Hensz tarafından elde edilmiştir. Altıntop çeşitleri arasında en koyu renge sahip çeşittir. Hem iç hem de dışı kırmızı renge sahiptir. Diğer çeşitlerden farklı olarak Star Ruby meyve et rengini mevsim boyunca daha iyi korur ve meyve kabuğu daha ince yapıdadır (Hensz 1971, 1977; Gmitter, 1995).

3.2. Yöntem

3.2.1. Klasik Yöntemlerle Sekonder Metabolitlerin Elde Edilmesi

3.2.1.1. Esansiyel Yağların Elde Edilmesi

Turunçgillerin sahip olduğu sekonder metabolitlerin klasik yöntemler kullanarak elde edilmesi için bitki materyallerine ait meyveler tam olgunluk döneminde alınmıştır. Steril su ile yıkanan meyvelerin kabukları, bir bıçak yardımı ile soyularak ayrılmıştır. Meyve kabuklarının bir kısmı etüvde kurutulmuş, bir kısmı ise küçük parçalara bölünerek dolapta muhafaza edilmiştir. Ayrıca albedolar meyve kabuklarından ayrılmıştır (Şekil 3.1).

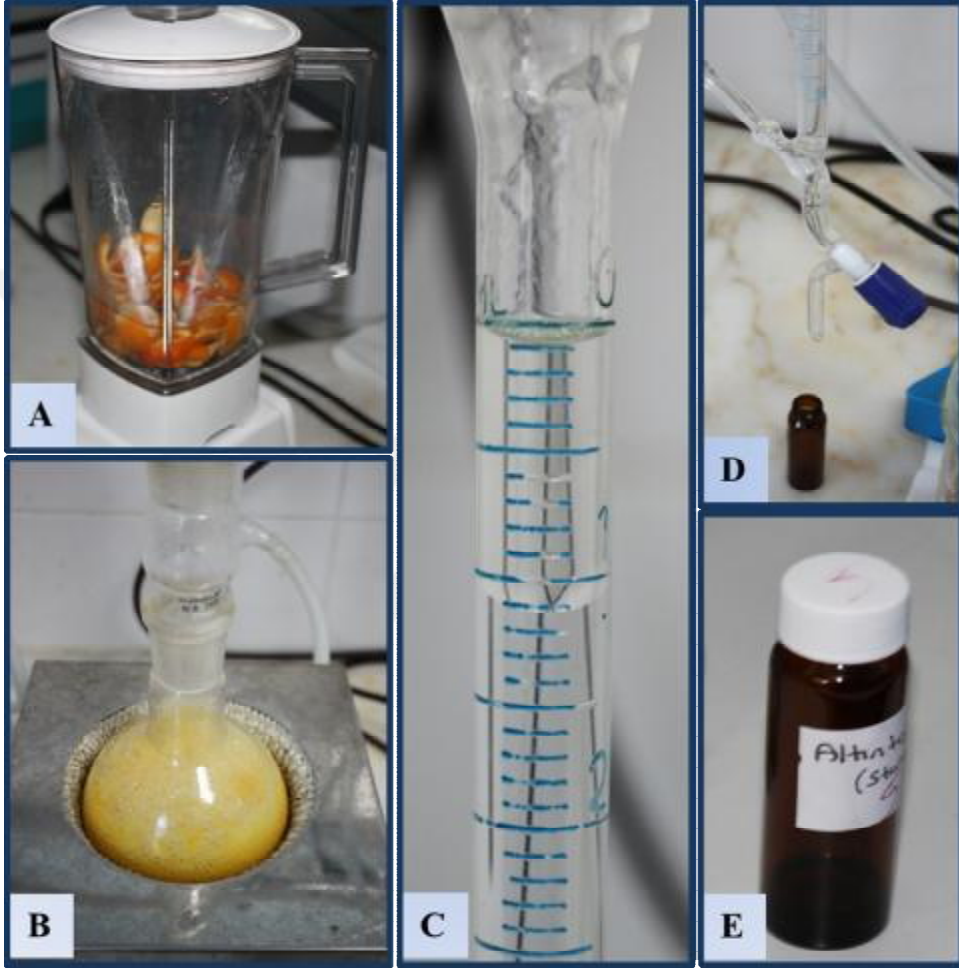


Şekil 3.1. Meyve kabuklarının çıkarılması. A: Dış kabuk. B: Kabukların paketlenmesi. C: Dış kabuk ile albedonun ayrılması. D: Albedo.

Meyve kabukları, ilk olarak Clavenger aparatı kullanılarak su buharı distilasyonuna tabi tutulmuştur. Bu distilasyon işlemi her bir meyve tür ve çeşitleri için üç farklı şekilde gerçekleştirilmiştir. Bunlar; 1. Küçük parçalara ayrılmış kabuk, 2. Blender ile öğütülmüş kabuk, 3. Kurutulmuş ve küçük parçalara ayrılmış kabuk şeklinde çalışılmıştır. Kurutma işleminde kabuklar, 60°C’de 18-24 saat bekletilmiştir.

Distilasyon işleminde küçük parçalara ayrılmış veya blender ile öğütülmüş kabuk için 400 mL distile su için 50 g kabuk kullanılmıştır. Distile su ve kabuklar ile hazırlanan bu karışım, Clavenger aparatına alınarak geri soğutucu altında 4 saat boyunca distilasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu sayede Turunçgillere ait uçucu yağlar elde edilmiştir. Distilasyon işlemi tamamlanana kadar Clavenger aparatının dereceli kısmından yağ miktarı kontrol edilerek mL olarak % yağ oranı kaydedilmiştir (Şekil 3.2). Hem yağ hem de kurutulmuş numuneler için % yağ

verimi; elde edilen esansiyel yağ miktarının (mL) yağ kabuk ağırlığına oranının 100 ile çarpılması ile hesaplanmıştır.



Şekil 3.2. Esansiyel yağların elde edilmesi ve muhafazası. A. Kabukların blender ile öğütülmesi. B. Öğütülmüş kabukların distilasyonu. C: Clavenger aparatının dereceli kısmına esansiyel yağların toplanması. D. Yağların kapaklı şişelere aktarılması. E: Esansiyel yağların şişelerde muhafaza edilmesi.

Distilasyon sonunda elde edilen yağlar kapaklı cam şişelere alınarak gaz kromatografisi/kütle spektrofotometrisi (GC-MS) ile analiz edilene kadar +4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.1.2. Esansiyel Yağların Kimyasal Analizleri

Turunçgil kabuklarına ait esansiyel yağların kimyasal bileşimlerini belirlemek amacı ile gaz kromatografisi/kütle spektrofotometresi (GC-MS) (Agilent Technologies) cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.3). Analizlerde dakikada 1 mL akış hızı ile taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılmıştır. Enjeksiyon port sıcaklığı 200°C’dir. Çalışmada kullanılan GC-MS koşulları Çizelge 3.1’deki gibidir.



Şekil 3.3. Esansiyel yağların kimyasal bileşimlerini belirlemek için kullanılan GC-MS sistemi.

Çizelge 3.1. Gaz Kromatografisi-Kütle spektrometre koşulları

Kolon	Agilent HP-5MS (30x250µm x 0.25µm)
Kolon Sıcaklığı	50°C'de 5 dk, 5°C/dk artışla 120°C'ye, 180-230°C 30°C/dk 280°C'de 2 dk beklenir.
Taşıyıcı Gaz	Helyum (1 mL/dk)
Enjektör Sıcaklığı	200°C
Elektron Enerjisi	71 eV
Akış Hızı	1.0 mL/dk

Farklı turuncgil tür ve çeşitlerinden elde edilen yağlar %1 oranında n-hekzan ile seyreltilerek viallere alınmıştır. Vialler, GC-MS üzerinde bulunan otomatik örnekleyiciye (autosampler) yerleştirilerek analizler başlatılmıştır. Tüm analizlerin sorunsuz tamamlanmasının ardından aktif bileşenler, GC-MS'teki uluslararası standartlara uygun olarak kütle spektral kütüphane bilgisi ile tanımlanmıştır. Pik alanı integrasyonuna dayanarak kantitatif hesaplamalar yapılmıştır.

3.2.2. Biyoteknolojik Yöntemlerle Sekonder Metabolitlerin Elde Edilmesi

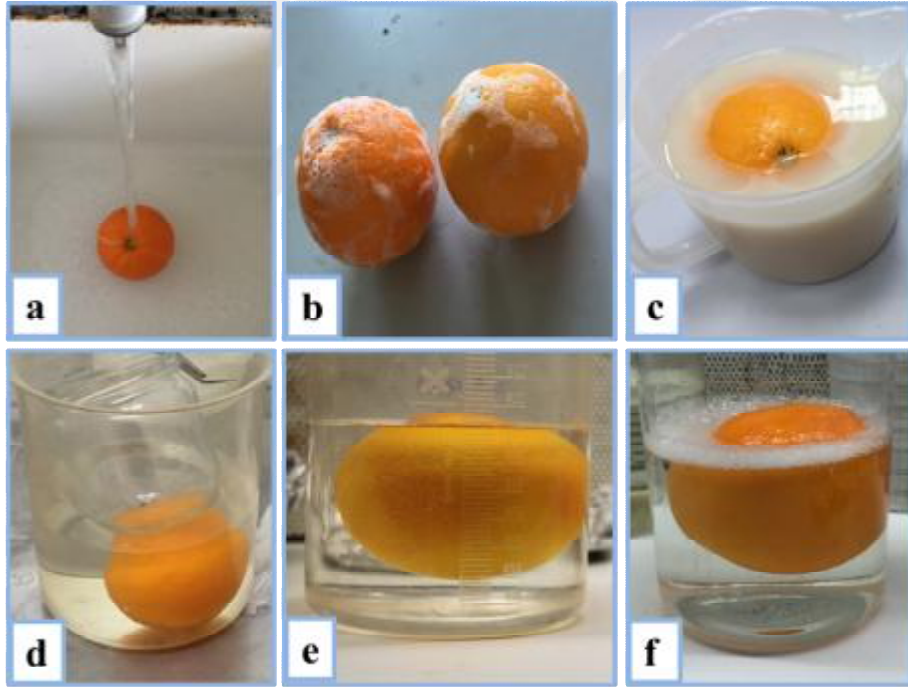
3.2.2.1. Kallus Kültürü

3.2.2.1.(1). Kültür Ortamları ve Sterilizasyon Çalışmaları

Sekonder metabolit içerikleri sebebi ile Washington navel portakal ve Star Ruby altıntop çeşitlerine ait olgun meyveler kallus kültürü çalışmalarında kullanılmıştır. Eksplant kaynağı olarak ise her bir meyveye ait flavedo, albedo ve meyve kesiti kullanılmıştır. Kültür öncesi yüzey sterilizasyon için meyveler bütün olarak kullanılmıştır. Yüzey sterilizasyonuna ait uygulamalar Çizelge 3.2 ve Şekil 3.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Yüzey sterilizasyon aşamaları

Uygulamalar	Süre
Çeşme suyu altında bekletme	15 dk
Bulaşık deterjanı ile yıkama	15 dk
Fungusit (Captan) uygulaması (%0.3)	15 dk
Saf su ile yıkama	3 kez
%0.1 HgCl ₂ + 2-3 damla Tween 20	30 dk
Saf su ile yıkama	3 kez
%70 EtOH	3 dk
%15 NaOCl + 2-3 damla Tween 20	15 dk
%15 NaOCl + 2-3 damla Tween 20	15 dk
Saf su ile yıkama	3 kez



Şekil 3.4. Meyvelerin yüzey sterilizasyonu. a. Çeşme suyunda bekletme, b. Deterjan ile yıkama, c. Fungusit içinde bekletme, d. HgCl₂ uygulaması, e. %70 EtOH uygulaması ve f. %15 NaOCl uygulaması.

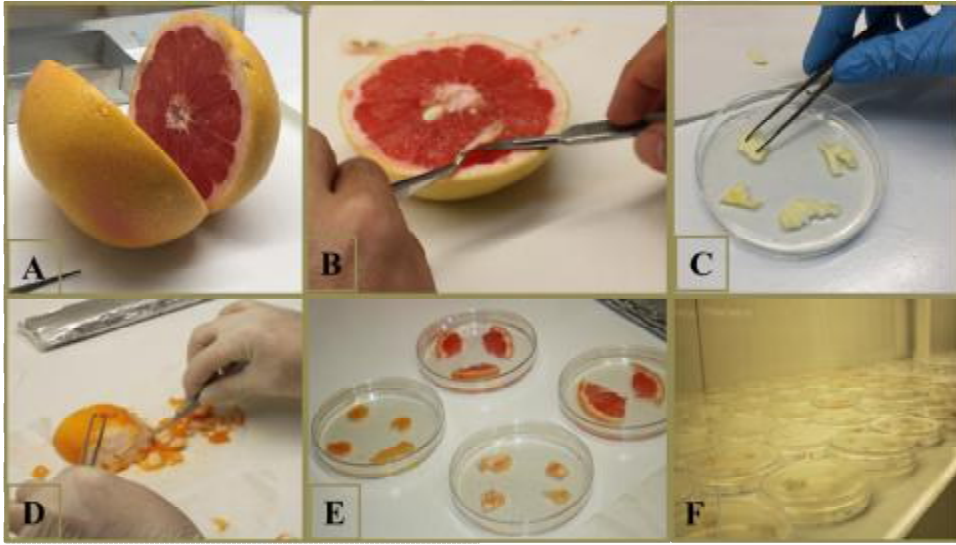
Kültür ortamı olarak MT ortamı (Murrashige ve Tucker, 1969) kullanılmıştır. Kullanılan MT ortam içeriği; MS tuzları (Murashige ve Skoog, 1962) + MT vitamin + Sakkaroz (30 g/L) + Bitki büyüme düzenleyicileri + Agar (8 g/L) ve pH 5.7 olacak şekilde hazırlanmıştır (Çizelge 3.3). Farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak ortam denemeleri yapılmıştır. Bitki büyüme düzenleyicilerinden Kinetin'in dört farklı konsantrasyonu (0.1, 1.0, 5.0 ve 10.0 mg/L) ve 2,4 D'nin (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) 3 farklı konsantrasyonu (0.1, 1.0 ve 2.0 mg/L) kullanılarak toplam 12 ortam kallus kültürü çalışmalarında kullanılmıştır. Kallus gelişimini teşvik etmek amacı ile her bir ortama %5 Hindistan cevizi sütü (Coconut Water, Sigma) eklenmiştir. Her ortam 1.05 atm basınç altında 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiş ve Hindistan cevizi sütü, otoklavdan sonra 0.22 µm por çapına sahip enjektör filtre ile steril edilerek ortamlara eklenmiş ve Petri kaplarına dökülmüştür.

Çizelge 3.3. MS tuzlarına (Murashige ve Skoog, 1962) ait makro-mikro elementler ve MT vitamin içeriği

Mikro Elementler (MS)	mg/L	Vitamin (MT)	mg/L
H ₃ BO ₃	6.2	Myo-inositol	100
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	Thiamine-HCl	10
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	Pyridoxine-HCl	10
MnSO ₄ .H ₂ O	15.6	Nicotinic acid	5
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	Glycine	2
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025		
KI	0.83		
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8		
Makro Elementler (MS)	mg/L		
MgSO ₄ .7H ₂ O	370		
KH ₂ PO ₄	170		
KNO ₃	1900		
NH ₄ NO ₃	1650		
CaCl ₂ .2H ₂ O	440		

3.2.2.1.(2). Örneklerinin Kültüre Alınması

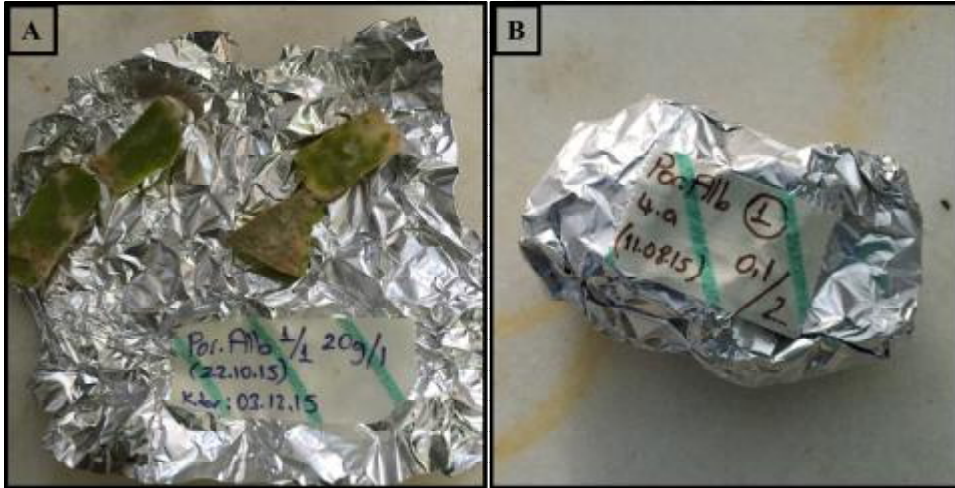
Yüzey sterilizasyonu tamamlanan meyve örnekleri steril kabin içerisinde kesilerek ikiye ayrılmıştır. Steril pens ve bisturi kullanılarak meyvelerden albedo, flavedo ve meyve kesiti eksplantları kesilerek ayrılmıştır. Her bir meyveye ait albedo ve flavedodan 4, meyve kesitinden 2 eksplant olacak şekilde petrilere aktarılmış ve etrafı streç film ile sarılmıştır (Şekil 3.5). Aktarma işleminden sonra petrilere 27°C ± 2°C sıcaklık ve 16/8 saat aydınlık/karanlık koşullara sahip kültür odasına alınmıştır. Eşit sayıda her bir ortam ve eksplant için örnekler hazırlanarak aynı kültür odasında tamamen karanlık koşullarda bekletilmiştir. Eksplantların kültüre alınmasından 4 hafta sonra altkültüre alma çalışmaları yapılmıştır. Alt kültürler her eksplant için 20 haftaya kadar devam etmiştir.



Şekil 3.5. Eksplantların kültür ortamlarına aktarılması. A. Meyvenin steril kabin içerisinde kesilmesi, B-D. Meyve ekplantının alınması, C-E. Eksplantların ortamlara aktarılması, F. Örneklerin kültür odasına alınması.

3.2.2.1.(3). Kallus Gelişimi için Uygun Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Belirlenmesi

Altkültürler boyunca kallus gelişimleri periyodik olarak gözlemlenmiş ve kallus ağırlık ölçümleri steril kabin içerisinde hassas terazi kullanılarak yapılmıştır. Kalluslar gelişim ve ağırlık yönünden değerlendirilerek uygun bitki büyüme düzenleyicilerini içeren ortamlar ve eksplantlar tespit edilmiştir. Kallus gelişimi en iyi ortamlardan 4 tanesi seçilerek yeni meyve girişleri için kullanılmıştır. Seçilen bu ortamlar, O1, O2, O3 ve O4 olmak üzere adlandırılmıştır. Eksplantların kültüre alınmasından 4 hafta sonra altkültüre alınmıştır. Birinci altkültürden başlayarak periyodik olarak kalluslar paketlenip sekonder metabolitlerin ekstraksiyonuna kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Kallusların muhafaza edilmesi. A. Kallusların besi ortamı kalıntılarından temizlenerek folyolara konulması ve B. Paketlenen kallusların ekstraksiyona kadar saklanması

3.2.2.1.(4). Sekonder Metabolit Üretimini Artırmak İçin Yapılan Çalışmalar

Seçilen 4 ortamdan birisi kullanılarak sekonder metabolit üretimini artırma çalışmaları yapılmıştır. Bunlar için stres faktörleri olarak bazı elisitörler ortamlara eklenmiştir. Bu amaçla; tamamen karanlık uygulaması, sakkaroz uygulaması (20-30-40 g/L) ve Metil jasmonat (MeJA) (0-7.5-10 μ M) uygulaması yapılmıştır. Stres faktörleri ile oluşan yeni ortamlar için yapılan uygulamalara göre yeni isimler verilmiştir (Çizelge 3.4).

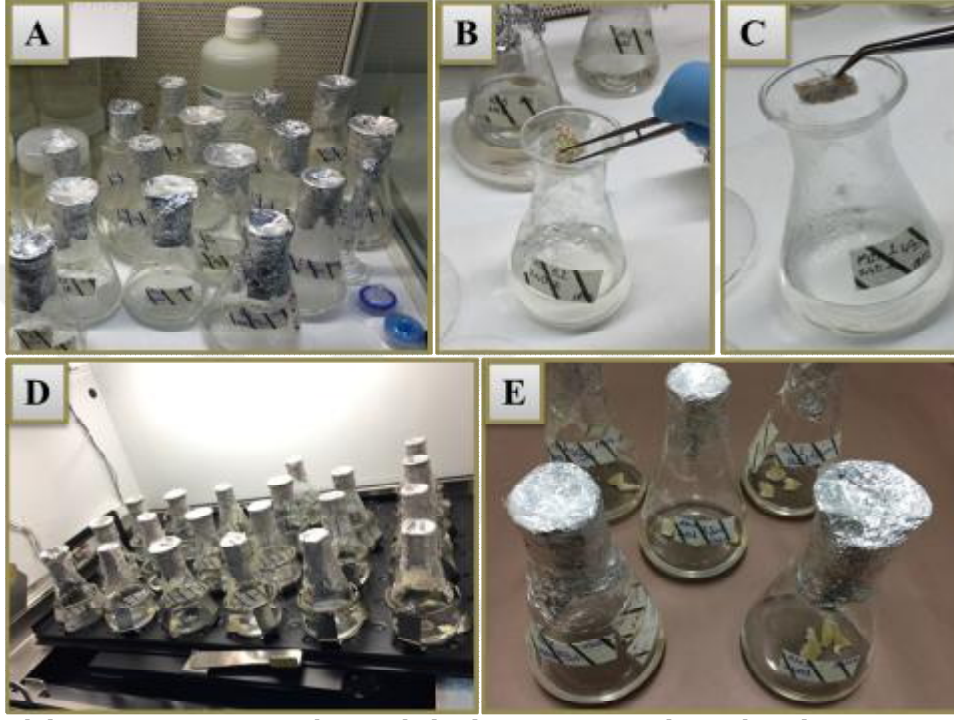
Çizelge 3.4. Elisitör denemelerinde kullanılan ortamlar ve ortamlara eklenen elisitör miktarları

Ortam	Sakkaroz (g/L)	Metil Jasmonat (μ M)
Kontrol	30	-
S1	20	-
S2	40	-
MJ1	30	7.5
MJ2	30	10

3.2.2.2. Süspansiyon Hücre Kültürleri

Süspansiyon kültürü çalışmaları için temel besi ortamı olarak MT ortamı + 1.0 mg/L Kinetin + 1.0 mg/L 2,4-D + Sakkaroz + %5 Hindistan cevizi sütü kullanılmıştır. Diğer uygulamalardan farklı olarak ortamlara agar eklenmemiştir. Temel besi ortamına ek olarak sekonder metabolit üretimini teşvik etmek için uygulanan ortamlar süspansiyon kültürleri için de kullanılmıştır. Aydınlik kültür koşullarının (16/8 saat aydınlık/karanlık) sekonder metabolit üretiminde daha iyi sonuç vermesi sebebi ile karanlık uygulamasına ait denemeler yapılmamıştır. Kültür ortamları, 250 mL'lik erlenler içerisinde 50 mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Meyvelere ait albedo eksplantları 15 gün boyunca katı ortamlarda geliştirildikten sonra süspansiyon kültürlerine alınmıştır. Kontaminasyonun önüne geçmek için erlenlerin ağzı steril alüminyum folyo ile kapatılarak dıştan streç film ile

sarılmıştır. Tüm erlenler 120 rpm çalkalama hızına ayarlanmış inkübatöre alınarak $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de kalluslar geliştirilmiştir.



Şekil 3.7. Süspansiyon hücre kültürleri. A. Ortamların hazırlanması, B-C. Kallusların ortamlara aktarılması, D. Örneklerin inkübatöre konulması ve E. Periyodik olarak örneklerin alınması.

Büyütme odalarında olduğu gibi inkübatörde de 16/8 saat aydınlık/karanlık koşullar sağlanmıştır (Şekil 3.7). Denemeler boyunca her 5 gün de bir örneklerle ait erlenler alınıp besi ortamları süzülerek uzaklaştırılmıştır. Kalluslar temizlenerek ortam kalıntılarından arındırılmıştır. Kalluslar paketlenerek sekonder metabolitlerin ekstraksiyonuna kadar -20°C 'de saklanmıştır.

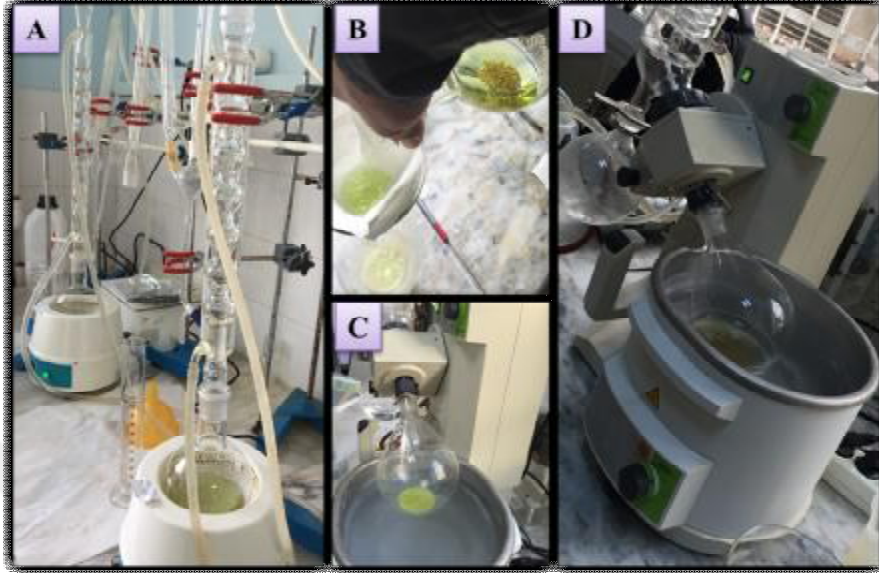
3.2.3. Sekonder Metabolitlerin Ekstraksiyonu

Washington Navel portakal ve Star Ruby altıntop çeşitlerinin meyvelerine ait albedo ve meyve kesiti dokularından geliştirilen kalluslar sekonder metabolit ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Düzenli aralıklarla alınarak -20°C’de muhafaza edilen kalluslar çıkarılarak buzlarının çözünmesi sağlanmıştır. Ortam kalıntılarının uzaklaştırılması için tekrar yıkanarak süzölmüştür. Kurutma kâğıdı kullanılarak kalluslardan fazla su uzaklaştırılmıştır. Ekstrakte edilecek kalluslar tartılarak bisturi yardımı ile küçük parçalara ayrılmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Kallusların ekstraksiyona hazır hale getirilmesi. A. Kallusların kurutma kâğıtlarında bekletilmesi, B. Kallusların küçük parçalara ayrılması.

Kallus parçaları 500 mL’lik balon içersine aktararak üzerine 100 mL, %70’lik etik alkol eklenmiştir. Örnekler geri soğutucu altında 2 saat kaynatılarak ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon sonundan kallus parçaları süzülerek uzaklaştırılmış ve etil alkol bir rotary evaporatör cihazı kullanılarak uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.9). İşlem sonunda ekstrakt tekrar süzöldükten sonra mezür ile ölçülerek falkon tüplerine alınmıştır. Tüplerin kapakları kapatılarak analizlere kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.



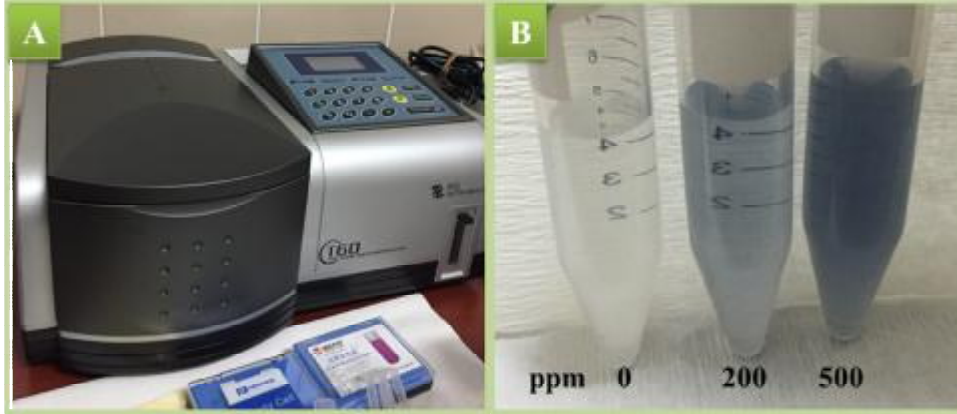
Şekil 3.9. Sekonder metabolitlerin ekstraksiyonu. A. Geri soğutucu altında ekstraksiyon işlemi, B. Ekstraksiyon sonu örneklerin süzülmesi, C-D. Etil alkolün rotary evaporatör cihazı yardımı ile uzaklaştırılması.

3.2.4. Sekonder Metabolitlerin Enstrümental Analizleri

3.2.4.1. Toplam Fenolik Bileşiklerin Belirlenmesi

Ekstrakte edilen örnekler toplam fenolik bileşiklerin belirlenmesi için kullanılmıştır. Ekstraktlar, analiz edilmeden önce 0.45 μm por çapına sahip enjektör filtre ile filtre edilerek eppendorf tüplere aktarılmıştır. Singleton ve Rossi (1965)'nin belirtmiş olduğu Folin Ciocalteu kolorimetik analiz metodu kullanılarak toplam fenolik bileşik analizleri yapılmıştır. Standart olarak farklı konsantrasyonlarda gallik asit çözeltileri kullanılmış ve standart kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Okumalar 765 nm dalga boyuna ayarlanmış bir spektrofotometre cihazı (T60 UV-vis, PG Instruments Ltd., UK) kullanılarak yapılmıştır (Şekil 3.10). Spektrofotometrik okumalara ait sonuçlar mg/g yaş ağırlık şeklinde Gallik Asit eşdeğeri olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.10. Toplam fenolik bileşik analizleri. A. Analizlerde kullanılan cihaz, B. Kontrol ve farklı konsantrasyonlardaki gallik asit standartları.

3.2.4.2. Naringin Miktarının Belirlenmesi

Ekstrakte edilerek falkon tüplerde muhafaza edilen örnekler 0.45 μm por çapına sahip enjektör filtre ile filtre edilerek eppendorf tüplere aktarılmıştır. Naringin ve diğer flavanon glikozidlerinin belirlenmesinde kullanılan Davis testi (Davis, 1947; Wagner ve ark., 1988) naringin miktarının tespit edilebilmesi için kullanılmıştır. Standart kalibrasyon eğrisi 25-300 ppm aralığında naringin çözeltisi kullanılarak oluşturulmuştur. Okumalar 420 nm dalga boyuna ayarlanmış bir spektrofotometre cihazı (T60 UV-vis, PG Instruments Ltd., UK) kullanılarak yapılmıştır. Örneklerin Naringin miktarı mg/g yaş ağırlık olacak şekilde hesaplanmıştır.

3.2.4.3. Naringin Miktarının HPLC Analizleri

Ekstraktlarda naringin analizi için yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) (Shimadzu, Kyoto, Japonya) kullanılmıştır (Şekil 3.11). Sistemin sahip olduğu özellikler Çizelge 3.5'te sunulmuştur. Spektrofotometrik yöntem kullanarak gerçekleştirilen naringin miktarı, daha gelişmiş bir teknik olan HPLC sistemi ile yeniden analiz edilmiştir.



Şekil 3.11. Naringin analizlerinde kullanılan HPLC sistemi

Çizelge 3.5. Naringin analizinde kullanılan HPLC sistemi ve Kromatografi koşulları

Fraksiyon Kolektör	FRC-10A
Degazör	DGU- 14A
Sistem Kontrolör	RID-10A
Pompa	LC-6AD
Dedektör	SPD-M10Avp DAD
Örnekleyici	SIL-10AF
Kolon Fırını	CTO-10ASVP
Kolon	Luna 5 µm C18 (250 x 4.6 mm)
Kolon sıcaklığı	35°C
Mobil faz	A: %75 su + %10 asetonitril + %10 metanol + %5 asetik asit
Akış hızı	1.0 mL/dk
Dalga Boyu	190-400 nm

Ekstraktlarda naringin miktarı, farklı konsantrasyonlardaki standart naringin çözeltisi ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi kullanılarak elde edilmiştir. Elde edilen

sonuçlar mg/g yaş ağırlık cinsinden hesaplanmıştır. Analizler 3 tekerrürlü yürütülmüştür.

3.2.5. Moleküler Analiz Çalışmaları

Toplam fenolik bileşik ve naringin analizleri sonucu elde ettiğimiz veriler değerlendirilerek moleküler analizler için uygun örnekler belirlenmiştir. Portakal ve Altıntop meyve albedoları ile sekonder metabolit miktarı ve gelişimlerine göre seçilen kalluslar RNA sekanslama çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.5.1. RNA İzolasyonu

Turuncgil kabuklarında sekonder metabolitlerin sentezinde rol alan genlerin tespit edilmesi amacı ile RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu için önceden sıvı azot ile öğütülerek -80°C'lik dolaba kaldırılmış albedo dokuları ile aynı dokulardan gelişmiş 3. altkültür kallusları kullanılmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Bitkisel kabuk dokularının öğütülmesi. A. Altıntop meyve kabuk dokularının ayrılması ve B. Albedo dokusunun sıvı azot ile öğütülmesi

RNA ekstraksiyonu için Zrei ve ark. (2012)'nın uyguladığı metod kullanılmıştır. Bu yöntemle göre iki farklı ekstraksiyon buffer hazırlanmıştır.

Ekstraksiyon Buffer I: Buffer içeriği, 2% CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), 25 mM EDTA (ethylene diamine tetra acetic acid), 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2.0 M NaCl, 0.5 g/L spermidine, 2% PVP (polyvinylpyrrolidone, molecular mass = 2.5 g/mol)'den oluşmaktadır. Solüsyon 121°C'de 20 dakika otoklav edilmiş ve kullanılmadan önce 50 µg/mL proteinaz K ilave edilmiştir.

Ekstraksiyon Buffer II: Buffer içeriği, 1.0 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0), %0.5 sodyum dodesil sülfat (SDS, Merck)'tan oluşmaktadır. Bu karışım hazırlandıktan sonra otoklav edilmiş (121°C'de 20 dakika) ve kullanımdan önce 65°C'ye kadar ısıtılmıştır.

RNA izolasyonu için aşağıdaki adımlar izlenmiştir;

- Ø Öğütülerek saklanan örneklerden 0.1 g alınarak 2 mL'lik tüplere aktarılmıştır. Üzerine önceden ısıtılmış (65°C) Ekstraksiyon Buffer I eklenmiş ve her bir tüpe 20 µL β-merkaptoetanol eklenmiştir. Tüpler karıştırılarak 65°C'de 15dk inkübe edilmiştir.
- Ø Tüpler 4°C'de 10 dakika boyunca 10.000 xg'de santrifüje tabi tutulmuştur.
- Ø Süpernatant alınarak 2 mL'lik yeni tüplere aktarılmış ve üzerine aynı miktarda kloroform:izoamil alkol (24:1) eklenmiştir. Karışım 13.000 xg'de 10 dk santrifüj edilmiştir (bu adım iki kez tekrar edilmiştir).
- Ø Santrifüjden sonra süpernatant yeni tüplere alınarak üzerine ¼ hacim 10 M lityum klorür (LiCl) eklenmiş ve tüpler ters çevrilip 4°C'de bir gece inkübe edilmiştir.
- Ø Tüpler 20 000xg'de 40 dk 4°C'de santrifüj edilmiştir.
- Ø Süpernatant dökülerek pelet 500 µL soğuk %70'lik etanol ile yıkanmış ve kısa santrifüj edilmiştir (Bu işlem iki kez tekrar edilmiştir).
- Ø Peletlere önceden ısıtılmış Ekstraksiyon Buffer II'den 300 µL eklenerek örnekler 65°C'de 15 dk bekletilmiştir.

- Ø Karışıma eşit hacimde kloroform ve izoamil alkol (24:1) eklenip karıştırılmıştır. Daha sonra 13000 xg'de 10 dk 4°C'de santrifüj edilmiştir (Bu aşama iki kez tekrar edilmiştir).
- Ø Santrifüjden sonra her bir tüpe 0.1 oranında 3 M Sodyum Asetat [NaOAc (pH: 5.2)] ve 0.6 oranında izopropanol eklenerek karıştırılmış ve -20°C'de 2 saat inkübe edilmiştir.
- Ø Tüplere 0.1 oranında 3 M Sodyum Asetat [NaOAc (pH:5.2)] ve 0.6 oranında isopropanol eklenmiştir. Karışım -20°C'de 2 saat inkübe edilmiştir.
- Ø Tüpler 20000 xg'de 30 dk 4°C'de santrifüj edilmiş ve daha sonra pelet %70'lik soğuk etanol ile yıkanarak kağıt havlu üzerinde 15 dk kurutulmuştur.
- Ø RNA peletleri üzerine 30 µL DEPC su ve DNase I (1 ünite/L µg RNA) eklenmiştir.

3.2.5.2. RNA Kalite ve Miktarının Belirlenmesi

Elde edilen RNA'ların kalite ve miktarını analiz etmek için Agilent Bioanalyzer 2100 ile NanoDrop spektrofotometre cihazları kullanılmıştır. Ek olarak 18S ve 28S ribozomal RNA alt birimlerinin varlığı agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirilmiştir. Jel elektroforezi için %0.05 etidyum bromür eklenmiş agaroz jel kullanılmış ve örnekler 100 voltta 2 saat koşturularak jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir.

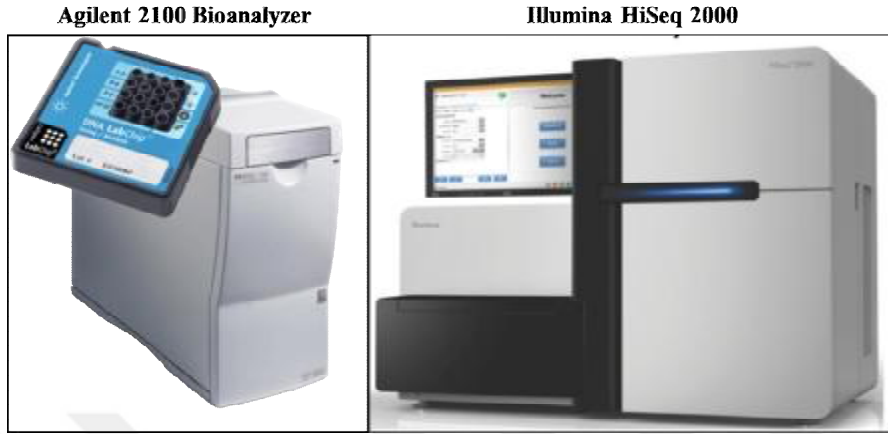
3.2.5.3. RNA Sekanslama Analizleri

Bitki albedo dokuları ve kalluslardan izole edilen RNA'ların sekanslanması Beijing Genomics Institute (BGI) tarafından yapılmıştır. Öncelikle total RNA'lardan mRNA'lar, Oligo (dT) tekniği kullanılarak izole edilmiştir. Uygun koşullarda izole edilen mRNA'lar parçalara ayrılmış ve daha sonra kalıp olarak kullanılan mRNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Son onarım ve tek

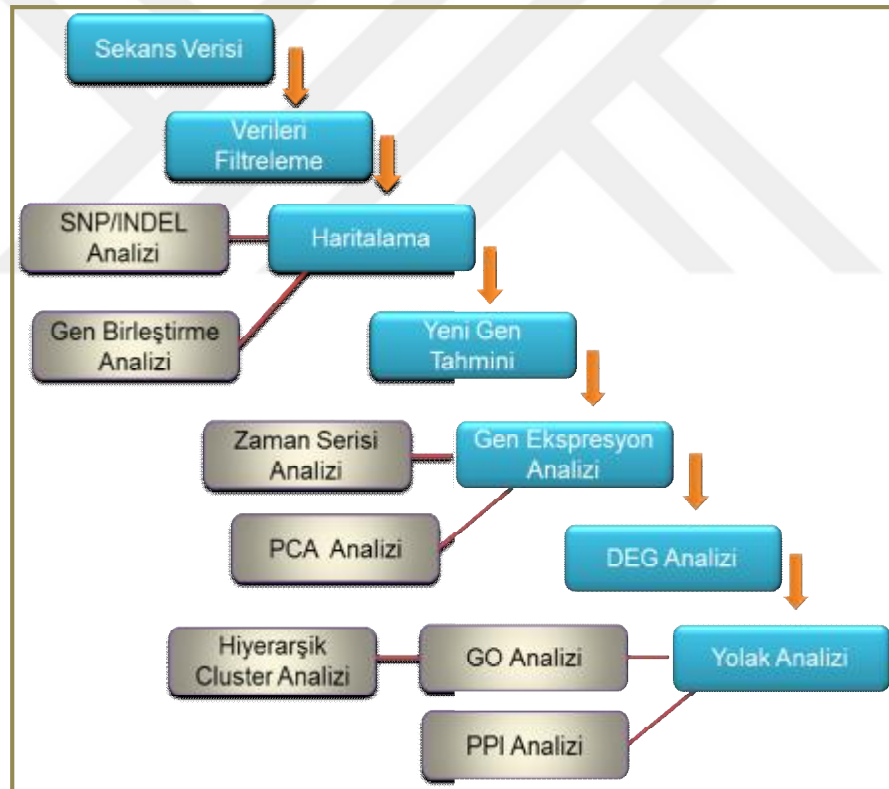
nükleotid A (adenin) ilavesi için cDNA fragmanları EB tamponu (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) içerisinde çözülerek saflaştırılmıştır. Uygun büyüklükteki cDNA parçaları seçilerek PCR amplifikasyonu için kullanılmıştır. Kütüphanenin oluşturulması ve miktarının belirlenmesi için Agilent 2100 Bioanalyzer ve ABI StepOnePlus Real-Time PCR Sistemi kullanılmıştır. Oluşturulan kütüphane Illumina HiSeq™ 2000 sistemi kullanılarak sekanslanmıştır (Şekil 3.13).

Biyoinformatik iş akışında ilk olarak temiz okumaları (Clean Reads) elde etmek için düşük kaliteli okumalar, adaptör ile okumalar ve bilinmeyen bazlar (%5'ten daha fazla) ile okumalar filtre edilmiştir. Daha sonra temiz okumalar referans genom üzerinde karşılaştırılarak haritalandırılmıştır. Bu çalışmada *Citrus clementina*'ya ait genom bilgisi referans olarak kullanılmıştır. Bu genom Uluslararası Turunçgil Genom Konsorsiyumu tarafından NCBI (National Center for Biotechnology Information) genom bankasına yüklenmiş ve genom boyutunun 301.365 Mb olduğu bildirilmiştir. Bu işlemde sonra yeni gen tahmini, SNP ve INDEL (tek nükleotid polimorfizm ve insersiyon/delesyon) analizleri ve gen birleştirme analizleri yapılmıştır. Devamında örnekler arasındaki farklı seviyelerde ifade olan genler (DEGs) tespit edilmiş ve cluster analizleri yapılmıştır (Şekil 3.14).

Referans genom ile dizilerin hizalanması sonucunda elde edilen veriler BAM formatında kaydedilerek IGV (Integrative Genomics Viewer) programı ile görüntülenmesi sağlanmıştır.



Şekil 3.13. RNA-Seq analizlerinde kullanılan sistemler



Şekil 3.14. Biyoinformatik analizlerinde iş akış diyagramı

3.2.5.3.(1). Sekans Okumalarının Filtrelenmesi

Elde edilen sekansların filtrelenmesi için SOAPnuke paket programı (<http://soap.genomics.org.cn/>) kullanılmıştır. Filtreleme işleminde aşağıdaki aşamalar takip edilmiştir.

1. Adaptörler ile sekansların birbirinden ayrılması,
2. Bilinmeyen bazların (%5'ten fazla) ayrılması,
3. Düşük kalitedeki okumaların kaldırılmasıdır (%15'in altında kaliteye sahip olanlar).

Filtrelemeden sonra elde edilen okumalar 'Temiz Okuma' (Clean Reads) olarak adlandırılarak FASTAQ formatında saklanmıştır.

3.2.5.3.(2). Genom Haritalama ve Referans Genom İle Sekansların Hizalanması

Haritalama çalışmalarında ve sekansların hizalanmasında oldukça hızlı, hassas ve yüksek doğrulukta bir yazılım olan HISAT (Hierarchical Indexing for Spliced Alignment of Transcripts) kullanılmıştır. Elde edilen sekanslar, referans olarak kullanılan ve genom boyutu 301.365 Mb olarak bildirilen *Citrus clementina*'ya ait genom bilgisiyle karşılaştırılmıştır.

3.2.5.3.(3). RNA Gen Ekspresyon Analizleri

Temiz okumaların referansa eşlenmesi için Bowtie2 kullanılmış ve gen ekspresyon seviyelerinin hesaplanması için RSEM (RNA-Seq by Expectation Maximization) yazılım programı kullanılmıştır.

Gen ekspresyon analizi için yaygın bir yöntem olan kümeleme analizleri kullanılarak örnekler arasında ifade olan genlerin farklılıkları ve benzerlikleri gösterilmiştir.

3.2.5.3.(4). Farklı Seviyelerde İfade Olan Genlerin (DEGs) Belirlenmesi ve Gen Ontoloji (GO) Analizleri

Farklı seviyelerde ifade olan genlerin belirlenmesi amacı ile PossionDis kullanılmıştır. PossionDis, Audic ve ark. (1997)'nın açıkladığı gibi poisson dağılımına dayanmaktadır.

Gen ontoloji analizleri için ise <http://www.geneontology.org> veri bankası kullanılmıştır. GO analiz sonuçları ile DEG'ler sınıflandırılmıştır. Hipergeometrik testlerde p değeri hesaplanması için aşağıdaki formül kullanılmıştır. Her p değeri için yanlış bulgu oranı hesaplanmıştır.

$$P = 1 - \sum_{i=0}^{m-1} \frac{\binom{M}{i} \binom{N-M}{n-i}}{\binom{N}{n}}$$

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Klasik Yöntemlerle Sekonder Metabolitlerin Elde Edilmesi

Çalışmalar kapsamında farklı turuncğil tür ve çeşitlerinin meyvelerine ait kabuklardan öncelikle klasik yöntemlerle sekonder metabolitlerin elde edilmesi hedeflenmiştir. İlk olarak monoterpenlerin majör bileşenleri olan esansiyel yağlar, Clavenger aparatı kullanılarak su buharı distilasyonu yöntemi ile elde edilmiştir. Distilasyon işlemi için kabuklar üç farklı şekilde hazırlanmış ve distilasyondan sonra Clavenger aparatının dereceli kısmı okunarak % yağ verimleri belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Turuncğil kabuklarına ait % esansiyel yağ verimleri (mL/g)

Bitkisel Materyal	UYGULAMALAR		
	Küçük Parçalı Kabuk	Kurutulmuş Küçük Parçalı Kabuk	Blender İle Öğütülmüş Kabuk
Satsuma Mandarin	0.4	0.57	1.6
Klemantin Mandarin	0.4	0.69	1.4
Meyer Limon	0.4	0.22	2.0
İnterdonat Limon	0.6	0.56	1.1
Washington Navel Portakal	0.38	0.41	4.0
Star Ruby Altıntop	0.3	0.56	1.8
Turunç	0.5	0.32	2.14
Moro Kan Portakal	0.2	0.19	4.6

Toplam 8 turunçgil çeşidinden esansiyel yağlar elde edilmiş ve bu yağların elde edilmesinde en iyi yöntemlerden birinin blender ile öğütme işleminin olduğu tespit edilmiştir. Kabukların küçük parçalara ayrılması ön işleminde tüm turunçgil çeşitleri birbirine benzer sonuçlar vermiştir. Özellikle satsuma mandarin, klemantin mandarin ve meyer limonun % esansiyel yağ verimleri aynı miktarda bulunmuştur. Kurutma ön işlemi, meyer limon ve turunçta olumsuz etki yaparken Klemantin mandarin ve Star Ruby altıntop çeşidinde yağ veriminin artmasını sağlamıştır. Benzer bir çalışmada Kamal ve ark. (2011) turunçgil kabuklarından esansiyel yağ elde etmek amacı ile farklı ön işlemler uygulamışlar ve yağ verimi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Kabukları havada kurutulmuş, fırında kurutulmuş ve taze olarak kullanmışlardır. Fırında kurutulmuş kabuklardan en yüksek yağ verimini (0.40-1.07 g/100g) elde etmelerine karşın en düşük verimi taze kabuklarda (0.20-0.30 g/100g) gözlemlemişlerdir. Tez çalışmalarında benzer sonuçlar olsa da kurutma işlemi, kullanılan her turunçgil çeşidi için yağ verimini artırmamıştır. Özellikle her iki portakal çeşidi ve interdonat limon için neredeyse hiç bir etkisi olmamıştır.

Kamal ve ark. (2013) yaptıkları farklı bir çalışmada portakal (*Citrus sinensis*), altıntop (*Citrus paradisi*) ve mandarin (*Citrus reticulata*) esansiyel yağlarını araştırmışlardır. Esansiyel yağları hidro-distilasyon yöntemi ile elde etmişler ve en yüksek verimi mandarin kabuklarında (0.30g/100g) gözlemlemişlerdir. En düşük yağ verimini ise altıntop kabuklarında (0.20g/100g) gözlemlemişlerdir. Yürütülen çalışmalardan blender ile öğütme ön işlemi dikkate alındığında en fazla yağ verimi (%4.0 - 4.6) portakal çeşitlerinde tespit edilirken en düşük verim (%1.1) interdonat limonunda gözlenmiştir. Portakal çeşitlerinden elde edilen veriler araştırmacıların bulduğu sonuçlardan oldukça yüksektir. Mandarin çeşitleri (%1.4 - 1.6) ile star ruby altıntop (%1.8) esansiyel yağlarının da yine yüksek miktarda olduğu gözlemlenmiştir. Ferhat ve ark. (2016) çalışmalarında limon kabuklarından esansiyel yağ elde etmek için hidrodistilasyon (HD), soğuk presleme ve mikrodalga klavenger veya hızlandırılmış distilasyon (MAD)

metotlarını karşılaştırmışlardır. Yağ verimleri dikkate alındığında HD (%0.21 w/w) ile MAD (%0.24 w/w) yöntemlerinin en iyi sonuç verdiği ve her iki metodun benzer sonuçlara sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, sadece meyer limonun kurutma ön işlemi sonucu elde edilen yağ miktarı (%0.22) ile benzer sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Kullanılan her iki limon çeşidi için çalışmalarda daha yüksek miktarda yağ eldesi gerçekleştirilmiştir.

4.1.1. Esansiyel Yağlara Ait Kimyasal Bileşiklerin Belirlenmesi

Turunçgil çeşitlerinden elde edilen esansiyel yağların analizleri, gaz kromatografisi-kütle spektrofotometresi (GC-MS) (Agilent Technologies) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Turunçgil çeşitlerine ait esansiyel yağların kimyasal içerikleri EK 1’de detaylı olarak sunulmuştur. Çalışmalarda kullanılan turunçgil yağlarının sahip olduğu kimyasal bileşikler arasında ortak olanlardan bazıları Çizelge 4.2’de sunulmuştur. GC-MS analizleri sonucunda tüm esansiyel yağların sahip olduğu kimyasal bileşikler arasında D-limonen’in majör bileşik olduğu tespit edilmiştir. Esansiyel yağ veriminde olduğu gibi D-limonen miktarında da yine her iki portakal çeşidinin (Washington Navel ve Moro) oldukça yüksek değere sahip olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Turunçgil esansiyel yağlarının sahip olduğu ortak kimyasal bileşiklerden bazıları

	α -pinene	Sabinene	β -pinene	β -myrcene	D-limonene
Satsuma Mandarin	1.29	0.22	0.45	2.30	86.33
Klemantin Mandarin	0.45	0.55	0.04	3.09	90.88
Meyer Limon	1.93	0.32	1.06	2.24	75.50
İnterdonat Limon	2.04	1.57	9.51	1.68	66.58
Washington Navel Portakal	0.91	0.92	0.04	2.63	92.01
Moro Kan Portakal	0.90	0.79	0.05	2.46	93.32
Star Ruby Altıntop	0.92	2.39	0.26	2.23	89.82
Turunç	0.80	0.26	0.81	2.39	89.30

Bu konuda yapılmış oldukça fazla çalışma bulunmaktadır. Birçoğu turunçgillerden esansiyel yağların elde edilmesi ve bu yağların kimyasal kompozisyonunun aydınlatılması ile ilgilidir. Ferhat ve ark. (2016) farklı metotlar kullanarak turunçgil kabuklarından esansiyel yağları elde etmişler ve kimyasal içeriklerini GC-MS ile analiz etmişlerdir. GC-MS sonuçlarına göre ana bileşenin D-limonen olduğunu tespit etmişlerdir. Washington navel portakalında yüksek D-limonen içeriğini soğuk pres (CP) (%94.89) yönteminde bulmuş olmalarına rağmen bu yöntemde yağ veriminin (%0.05 w/w) oldukça düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Limonda (Eureka) ise limonen miktarının %69.65-75.68 arasında olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer olarak tez kapsamında elde edilen sonuçlarda da majör bileşiğin d-limonen olduğu tespit edilmiştir. Çalışmalarda kullanılan hidrodistilasyon yönteminde elde edilen yağların GC-MS sonuçlarına göre limon

çeşitlerinin %66.58 - 75.50 oranında D-limonen içerdiği tespit edilmiştir. Bu verilere göre araştırmacıların çalışması ile benzer sonuçlar gözlemlenmiştir.

Geraci ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada 12 portakal çeşidine ait kabuklardan esansiyel yağları buhar distilasyonu ile elde etmişlerdir. Ek olarak seçtikleri 5 örneği hekzan ile ekstrakte etmişlerdir. Kimyasal bileşenleri GC-MS kullanarak analiz etmişlerdir. Esansiyel yağlarda toplam 54 bileşik tespit ederek bu bileşikler içerisinde D-limonenin majör bileşik olduğunu ve miktarının %73.9 ile %97.6 arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Manaila ve ark. (2016) beş farklı turunçgil çeşidine ait uçucu yağların verimini ve kimyasal kompozisyonunu çalışmışlardır. Esansiyel yağları hidrodistilasyon ile elde etmişler, analizleri ise GS-MS ve FTIR (Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre) kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Tüm yağlarda D-limonen'in (%80.26 - 98.68) ana bileşik olduğunu tespit etmişlerdir. En yüksek yağ verimini altıntopta (%2.47) gözlemlerken en düşük yağ verimini şadokta (%0.53) gözlemlemişlerdir. Çalışmalar kapsamında yürütülen GC-MS sonuçlarına göre ise D-limonen miktarının %66.58 (Interdonat limon) ile %93.32 (Moro kan portakal) olduğu tespit edilmiştir.

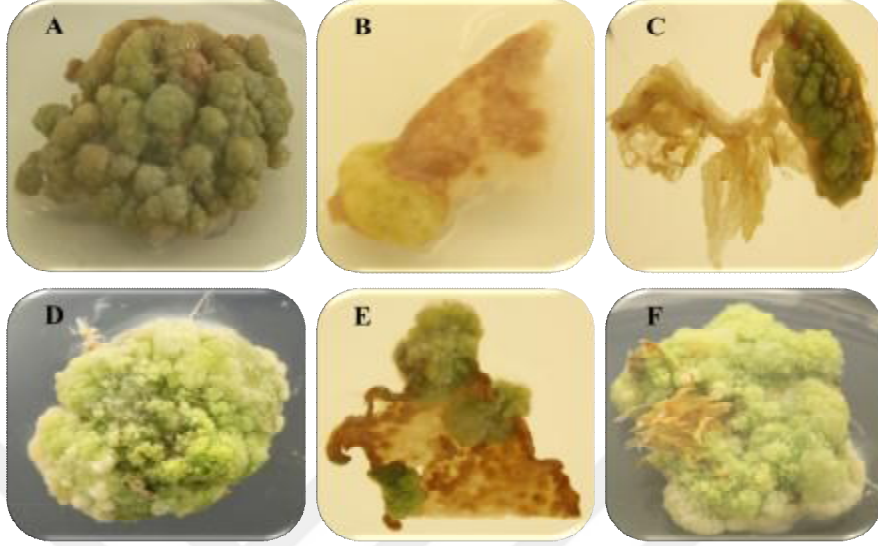
Yürütülen çalışmalar ve önceki çalışmalar dikkate alınarak sekonder metabolitlerin biyoteknolojik yöntemlerle elde edilmesi çalışmalarında kullanılacak bitkisel materyallerin portakal ve altıntop olduğu belirlenmiştir.

4.2. Biyoteknolojik Yöntemlerle Sekonder Metabolitlerin Elde Edilmesi

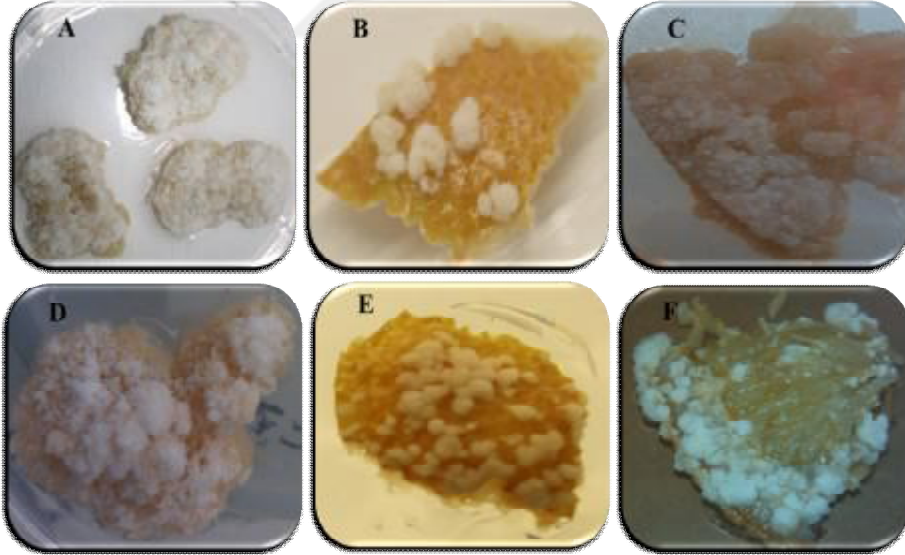
4.2.1. Kallus Kültürü

4.2.1.1. Uygun Eksplant, Besi Ortamı ve Kültür Şartlarının Belirlenmesi

Kallus kültürü çalışmalarında, 'Washington Navel' portakal ve 'Star Ruby' altıntop meyvelerine ait eksplantlar kullanılmıştır. Kallus gelişimleri periyodik olarak kontrol edilmiş ve her dört haftada bir alt kültüre alınmıştır. Karanlık ve aydınlık kültür koşullarında gelişim gösteren kalluslar Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Aydınlik kültür koşullarında 'Washington Navel' portakal ve 'Star Ruby' altıntop meyve eksplantlarından gelişen kalluslar. A. Altıntop albedo, B. Altıntop kabuk, C. Altıntop meyve kesiti, D. Portakal albedo, E. Portakal kabuk, F. Portakal meyve kesiti.



Şekil 4.2. Karanlık kültür koşullarında 'Washington Navel' portakal ve 'Star Ruby' altıntop meyve eksplantlarından gelişen kalluslar. A. Altıntop albedo, B. Altıntop kabuk, C. Altıntop meyve kesiti, D. Portakal albedo, E. Portakal kabuk, F. Portakal meyve kesiti.

Kallus kültürü çalışmaları üç tekerrürlü olarak yürütülmüş ve meyvelere ait kallusların gelişimleri yüzde (%) olarak hesaplanmıştır. Bitkisel materyal, eksplant kaynağı, kallus ağırlık farkı (1. altkültür ile 3. altkültür arasındaki gram (g) olarak ağırlık farkı) ve gelişim yüzdelерinin varyans analizleri JMP-8 istatistik paket programına yüklenerek farklı bitki büyüme düzenleyicileri ile hazırlanmış 12 ortam değerlendirilmiştir. Ortalamalar arasındaki farklar LSD çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırılmıştır. Aydınlık (16/8 saat aydınlık/karanlık) (Çizelge 4.3 ve 4.4) ve karanlık (tamamen karanlık) (Çizelge 4.5 ve 4.6) kültür koşullarında gelişen kalluslar ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

İstatistik sonuçları dikkate alındığında aydınlık kültür koşullarında tüm faktörlerin değerlendirilmesi ile kallus gelişimi portakalda altıntopa göre daha iyi sonuç vermiştir. Buna göre hesaplanan gelişim ortalaması, portakal için %36.26 ve altıntop için ise %27.00 olarak tespit edilmiştir. Portakal ve altıntop sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi ile eksplant kaynağı olarak en iyi gelişim %52.31 ile albedo'da gözlenmiştir. Meyve kesitinde %42.12 ve kabukta ise %0.46 olarak hesaplanmıştır. Hem istatistik sonuçları hem de yapılan gözlemler değerlendirildiğinde kabuk eksplantının iyi bir gelişim göstermediği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. Aydınlik kültür koşullarında farklı bitkisel materyal, eksplant ve ortamlarda gelişen kallusların oranı (%).

AYDINLIK			PORTAKAL			ALTINTOP		
			Gelişim			Gelişim		
mg/L			Albedo	Kabuk	Meyve kesiti	Albedo	Kabuk	Meyve kesiti
Kinetin 0.1	2,4 D	0.1	55.55 (48.24) cdef	0 (0) ı	88.88 (78.24) ab	0 (0) ı	0 (0) ı	0 (0) ı
		1.0	88.88 (78.24) ab	0 (0) ı	72.22 (63.24) abcd	77.77 (66.48) abcd	0 (0) ı	66.66 (60) bcd
		2.0	77.77 (66.48) abcd	0 (0) ı	66.66 (60) bcd	100 (90) a	0 (0) ı	55.55 (48.24) cdef
Kinetin 1.0	2,4 D	0.1	0 h	0 (0) ı	0 (0) ı	8.33 (10) hı	0 (0) ı	0 (0) ı
		1.0	77.77 (66.48) abcd	11.11 (11.75) hı	100 (90) a	100 (90) a	0 (0) ı	0 (0) ı
		2.0	100 (90) a	0 (0) ı	0 (0) ı	77.77 (71.75) abc	0 (0) ı	0 (0) ı
Kinetin 5.0	2,4 D	0.1	55.55 (53.50) bcde	0 (0) ı	66.66 (60) bcd	22.22 (18.24) ghı	0 (0) ı	0 (0) ı
		1.0	22.22 (18.24) ghı	0 (0) ı	83.33 (75) abc	66.66 (59.99) bcd	0 (0) ı	83.33 (75) abc
		2.0	66.66 (59.99) bcd	0 (0) ı	88.88 (78.24) ab	80.55 (68.24) abcd	0 (0) ı	0 (0) ı
Kinetin 10.0	2,4 D	0.1	22.22 (18.24) ghı	0 (0) ı	0 (0) ı	0 (0) ı	0 (0) ı	83.33 (75) abc
		1.0	55.55 (53.50) bcde	0 (0) ı	0 (0) ı	44.44 (41.75) defg	0 (0) ı	0 (0) ı
		2.0	22.22 (23.50) fghı	0 (0) ı	83.33 (75) abc	33.33 (29.99) efgh	0 (0) ı	72.22 (63.24) abcd

LSD bitkisel materyal: 4.52***

LSD ortam: 11.07***

LSD eksplant: 5.53***

LSD bitki x eksplant x ortam: 27.12***

Çizelge 4.4. Aydınlık kültür koşullarında farklı bitkisel materyal, eksplant ve ortamlarda gelişen kallusların ağırlık oranı.

AYDINLIK			PORTAKAL			ALTINTOP		
			Ağırlık Farkı (g)			Ağırlık Farkı (g)		
mg/L			Albedo	Kabuk	Meyve kesiti	Albedo	Kabuk	Meyve kesiti
Kinetin 0.1	2,4 D	0.1	0.22 klmnopq	0 q	0.62 cdefg	0.03 nopq	0 q	0 q
		1.0	1.02 b	0 q	0.55 efghi	0.56 efghi	0 q	0.39 fghijkl
		2.0	0.98 b	0 q	0.79 bcde	2.17 a	0 q	0.43 fghijk
Kinetin 1.0	2,4 D	0.1	0 q	0 q	0 q	0.05 mnopq	0 q	0 q
		1.0	0.62 cdefg	0.01 pq	0.32 hijklm	0.88 bcd	0 q	0 q
		2.0	0.60 defgh	0 q	0 q	0.31 hijklmn	0 q	0 q
Kinetin 5.0	2,4 D	0.1	0.25 jklmnopq	0 q	0.32 hijklm	0 q	0 q	0 q
		1.0	0.13lmnopq	0 q	0.28 ijklmnop	0.51 efghij	0.03 opq	0.26 jklmnopq
		2.0	0.88 bc	0 q	0.35 ghijkl	0.64 cdef	0 q	0 q
Kinetin 10.0	2,4 D	0.1	0.17 klmnopq	0 q	0 q	0.03 opq	0 q	0.62 cdefg
		1.0	0.35 ghijkl	0 q	0 q	0.40 fghijkl	0 q	0 q
		2.0	0.11 lmnopq	0 q	0.31 ijklmno	0.25 jklmnopq	0 q	0.23 jklmnopq

LSD bitkisel materyal: 0,04***

LSD ortam: 0,11***

LSD eksplant: 0,05***

LSD bitki x eksplant x ortam: 0,28***

Çizelge 4.5. Karanlık kültür koşullarında farklı bitkisel materyal, eksplant ve ortamlarda gelişen kallusların oranı (%).

KARANLIK			PORTAKAL			ALTINTOP		
			Gelişim			Gelişim		
mg/L			Albedo	Kabuk	Meyve kesiti	Albedo	Kabuk	Meyve kesiti
Kinetin 0.1	2,4 D	0.1	100 (90) a	0 (0) g	100 (90) a	88.88 (78.24) ab	0 (0) g	83.33 (75) ab
		1.0	100 (90) a	88.88 (78.24) ab	0 (0) g	88.88 (78.24) ab	0 (0) g	83.33 (75) ab
		2.0	88.88 (78.24) ab	0 (0) g	0 (0) g	100 (90) a	0 (0) g	0 (0) g
Kinetin 1.0	2,4 D	0.1	66.66 (59.99) bcd	0 (0) g	0 (0) g	100 (90) a	0 (0) g	0 (0) g
		1.0	88.88 (78.24) ab	100 (90) a	0 (0) g	100 (90) a	77.77 (66.48) bc	0 (0) g
		2.0	100 (90) a	88.88 ab	100 (90) a	100 (90) a	0 (0) g	83.33 (75) ab
Kinetin 5.0	2,4 D	0.1	55.55 (48.24) cde	0 (0) g	0 (0) g	100 (90) a	0 (0) g	88.88 (78.24) ab
		1.0	66.66 (59.99) bcd	0 (0) g	0 (0) g	88.88 (78.24) ab	0 (0) g	100 (90) a
		2.0	33.33 (29.99) ef	0 (0) g	0 (0) g	100 (90) a	100 (90) a	100 (90) a
Kinetin 10.0	2,4 D	0.1	44.44 (41.75) def	0 (0) g	0 (0) g	61.10 (51.48) cd	0 (0) g	88.88 (78.24) ab
		1.0	33.33 (23.50) f	0 (0) g	100 (90) a	100 (90) a	0 (0) g	0 (0) g
		2.0	55.55 (48.24) cde	0 (0) g	0 (0) g	100 (90) a	0 (0) g	100 (90) a

LSD bitkisel materyal: 3.36*** LSD ortam: 8.23***

LSD eksplant: 4.11***

LSD bitki x eksplant x ortam: 20.16***

Çizelge 4.6. Karanlık kültür koşullarında farklı bitkisel materyal, eksplant ve ortamlarda gelişen kallusların ağırlık oranı.

KARANLIK			PORTAKAL			ALTINTOP		
			Ağırlık farkı (g)			Ağırlık farkı (g)		
mg/L			Albedo	Kabuk	Meyve kesiti	Albedo	Kabuk	Meyve kesiti
Kinetin 0.1	2,4 D	0.1	0.80 lmnopq	0 t	1.07 ijklm	2.01 abcd	0 t	1,53 fgh
		1.0	0.67 nopqr	0.97 klmno	0 t	1.02 klmn	0 t	2.18 ab
		2.0	0.96 klmnop	0 t	0 t	1.67 defg	0 t	0 t
Kinetin 1.0	2,4 D	0.1	0.68 nopqr	0 t	0 t	0.99 klmn	0 t	0 t
		1.0	0.89 klmnop	1.22 hijk	0 t	0.22 st	0.61 pqr	0 t
		2.0	0.73 mnopqr	1.13 ijkl	1.56 efgh	1.38 ghij	0 t	1.90 bcde
Kinetin 5.0	2,4 D	0.1	0.53 qrs	0 t	0 t	0.54 qrs	0 t	1.52 fgh
		1.0	0.63 opqr	0 t	0 t	1.00 klmn	0 t	2.35 a
		2.0	0.48 qrs	0 t	0t	1.06 jklm	1.78 cdef	1.50 fgh
Kinetin 10.0	2,4 D	0.1	0.42 rs	0 t	0 t	0.49 qrs	0 t	1.53 fgh
		1.0	0.42 rs	0 t	2.05 abc	0.51 qrs	0 t	0 t
		2.0	0.77 mnopqr	0 t	0 t	1.23 hijk	0 (0) G	1.42 ghi

LSD bitkisel materyal: 0.05***

LSD ortam: 0.14***

LSD eksplant: 0.07***

LSD bitki x eksplant x ortam: 0.35***

Turuncgil meyve kabuklarından kallus elde edilmesi ile ilgi oldukça sınırlı çalışma olmasına rağmen Brunet ve Ibrahim (1973) portakal ve limona ait meyve kabuğundan (albedo dokusu ayrılmış) kallus elde etmişlerdir. Kallus elde edilmesi ve devamlılığı için ise hindistan cevizi sütünü kullanmışlardır.

Kültür ortamları gelişim yönünden değerlendirildiğinde ise en iyi sonuç veren 4 ortam; 0.1 mg/L kinetin + 1.0 mg/L 2,4D içeren ortam %50.92, 0.1 mg/L kinetin + 2.0 mg/L 2,4D içeren ortam %49.99, 1 mg/L kinetin + 1.0 mg/L 2,4D içeren ortam %48.14 ve 5.0 mg/L kinetin + 1.0 mg/L 2,4D içeren ortam %42.59 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3).

Aydınlık kültür koşullarında gelişen kallusların ağırlık değişimleri dikkate alındığında önemli bir fark olmamakla beraber portakalın 0.24 g, altıntopun ise 0.21 g olduğu hesaplanmıştır. Eksplantlar değerlendirildiğinde en iyi gelişim gösteren eksplantın albedo (0.46 g) olduğu gözlenmiştir. Diğer eksplantlardan meyve kesiti için ağırlık farkı 0.22 g ve kabuk için ise 0.001 g hesaplanmıştır. Bitki büyüme düzenleyicileri ile hazırlanan ortamlara ait sonuçlar değerlendirildiğinde; 0.1 mg/L kinetin + 2.0 mg/L 2,4D (0.72 g), 0.1 mg/L kinetin + 1 mg/L 2,4D (0.42 g), 5.0 mg/L kinetin + 2.0 mg/L 2,4D (0.31 g) ve 1 mg/L kinetin + 1 mg/L 2,4D (0.30 g) içeren ortamların en iyi 4 ortam olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.4).

Karanlık kültür koşullarındaki verilerin değerlendirilmesi sonucunda meyve kesitlerinin kallus gelişimi; altıntop için %56.48 ve portakal için ise %39.19 olarak bulunmuştur. Aydınlık koşullara benzer olarak burada da en iyi gelişim gösteren eksplantın albedo (%81.71) olduğu tespit edilmiştir. Meyve kesiti eksplantında %42.82 ve kabuk eksplantında ise %18.98 olarak hesaplanmıştır. Kültür ortamları gelişim yönünden değerlendirildiğinde en iyi sonuç veren 4 ortam; 1 mg/L kinetin + 2.0 mg/L 2,4D içeren ortam %78.70, 0.1 mg/L kinetin + 0.1 mg/L 2,4D içeren ortam %62.03, 1 mg/L kinetin + 1 mg/L 2,4D içeren ortam %61.11 ve 0.1 mg/L kinetin + 1.0 mg/L 2,4D içeren ortam %60.18 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.5).

Karanlık kültür koşullarında gelişen kallusların ağırlık farkları altıntop için 0.79 g ve portakal için 0.44 g olarak tespit edilmiştir. Eksplantlar değerlendirildiğinde albedo (0.84 g) ile meyve kesitinin (0.77 g) yakın değerler vermesine karşın kabuk eksplantının 0.23 g olduğu hesaplanmıştır. Bitki büyüme düzenleyicileri ile hazırlanan ortamlara ait sonuçlar değerlendirildiğinde ise; 1.0

mg/L kinetin + 2.0 mg/L 2,4D (1.12 g), 0.1 mg/L kinetin + 0.1 mg/L 2,4D (0.90 g), 0.1 mg/L kinetin + 1.0 mg/L 2,4D (0.81 g) ve 5.0 mg/L kinetin + 2.0 mg/L 2,4D (0.80 g) içeren ortamlar iyi sonuç vermiştir. Farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicilerin kallus oluşumu üzerinde önemli etkilerinin olduğunu vurgulayan oldukça fazla çalışma mevcuttur (Rayle ve ark., 1982; Popescu ve ark., 1997; Kramut ve Te-chato, 2010; Amiri ve ark., 2013). Kamruzzaman ve ark. (2015) *Citrus reticulata* Blanco. ve *Citrus medica* L. çeşitlerine ait tohumlardan yeni bitkicikler geliştirmişlerdir. Bu bitkiciklerin sürgün ve yapraklarını kullanarak kallus elde etmek amacı ile ortam denemeleri yapmışlardır. *C. reticulata* tohumları, 6-benzilaminopurin (BAP) (0.5 mg/L) + 1-naftalinasetik asit (NAA) (2.0 mg/L) + kinetin (KIN) (1.0 mg/L) ile desteklenmiş MS (1/2 oranında) ortamında iyi çimlenme (%90) gösterirken, *C. medica* tohumlarında BAP (1.0 mg/L) + NAA (0.5 mg/L) daha iyi sonuç (%92) vermiştir. *C. reticulata*'ya ait yaprak ve sürgün eksplantlarında 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) (1.0 mg/L) + BAP (0.5 mg/L) + NAA (0.25 mg/L) içeren ortamın sürgün eksplantları için (%95), 2,4-D (1.0 mg/L) içeren ortamın ise yaprak eksplantları (%90) için ideal kallus kültürü ortamı olduğu bulunmuştur. *C. medica*'nın hem yaprak hem de sürgün eksplantlarında 2,4-D (1.0 mg/L) içeren ortamın kallus gelişiminde (%80) başarılı olduğunu tespit etmişlerdir. Yürütülen tez çalışmaları kapsamında kinetin ve 2,4 D'nin kallus gelişiminde oldukça etkili olduğu belirlenmiştir.

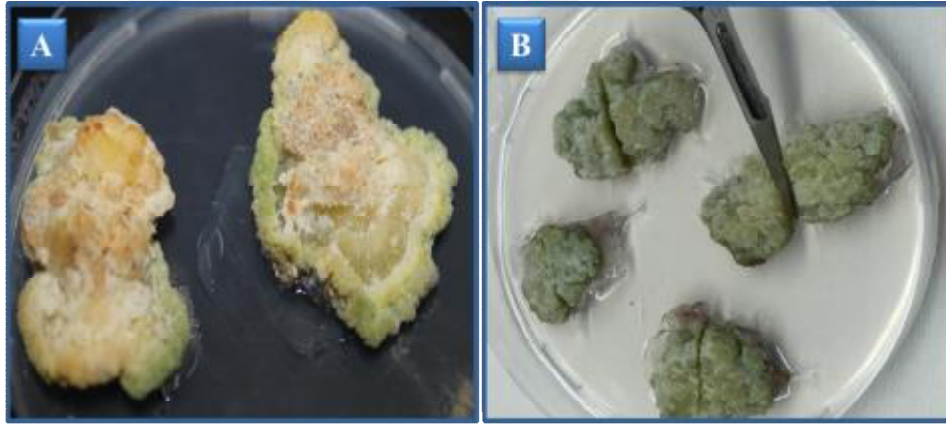
İstatistik sonuçları ve gözlemlerin değerlendirilmesi ile 12 ortamdan en uygun bitki büyüme düzenleyicilerini içeren 4 ortam (0.1 mg/L kinetin + 1.0 mg/L 2,4D, 0.1 mg/L kinetin + 2.0 mg/L 2,4D, 1.0 mg/L kinetin + 1.0 mg/L 2,4D ve 5.0 mg/L kinetin + 1.0 mg/L 2,4D) seçilmiştir. Yeniden adlandırılan bu ortamlar Çizelge 4.7'de sunulmuştur. Ek olarak kallus gelişimi çok başarılı olmayan meyve kabuğu eksplantı çalışmalarda kullanılmamıştır. Bu ortamlar ve iki eksplant kaynağı (albedo ve meyve kesiti) sekonder metabolitlerin biyoteknolojik yöntemlerle elde edilmesi amacı ile kallus kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.

Çizelge 4.7. MT besin ortamına eklenen bitki büyüme düzenleyicileri ile ortamlara verilen kısa kodlar

Ortam	Farklı Konsantrasyonlardaki Bitki Büyüme Düzenleyicileri
O1	0.1 mg/L Kinetin + 1 mg/L 2,4D
O2	0.1 mg/L Kinetin + 2 mg/L 2,4D
O3	1.0 mg/L Kinetin + 1 mg/L 2,4D
O4	5.0 mg/L Kinetin + 1 mg/L 2,4D

4.2.1.2. Sekonder Metabolitlerin Biyoteknolojik Üretimi için Gerekli Kallusların Geliştirilmesi

Portakal ve altıntop meyvelerine ait eksplantlar kullanılarak seçilen dört ortamda tekrar kültüre alınmışlardır. Yeteri kadar kallusu elde etmek için çok sayıda kültüre alma işlemi yapılmış ve gelişen kalluslar büyüklüklerine göre altkültürler boyunca parçalara ayrılmıştır.



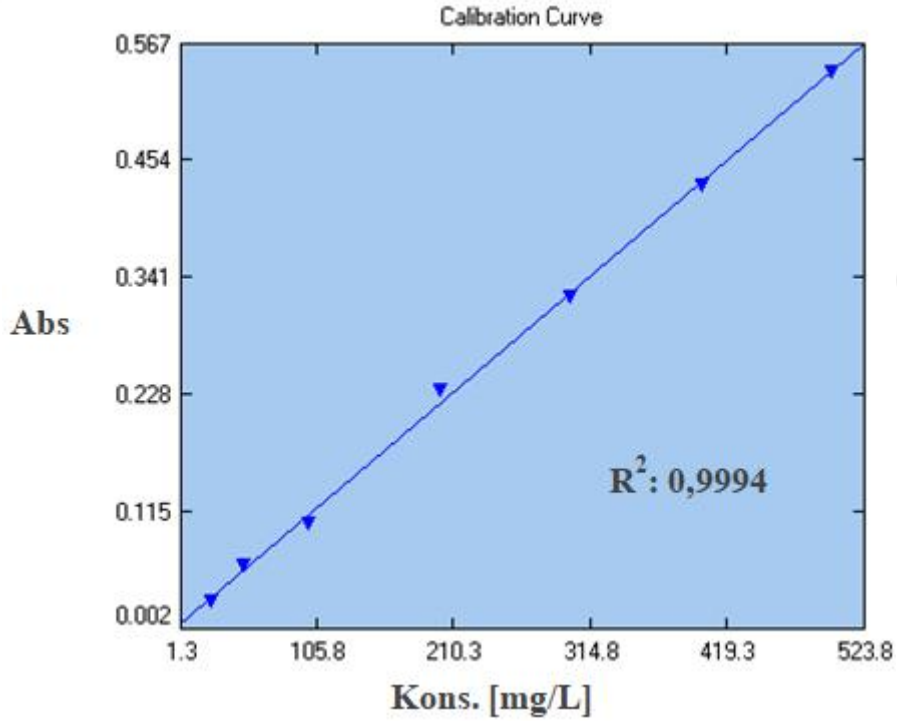
Şekil 4.3. Kallusların geliştirilmesi (A) ve büyüyen kallusları parçalara ayrılarak (B) altkültüre alınması.

Bu ortamlarda gelişen kalluslardan sekonder metabolitlerin ekstraksiyonu yapılarak toplam fenolik bileşik ve naringin miktar analizleri yapılmıştır.

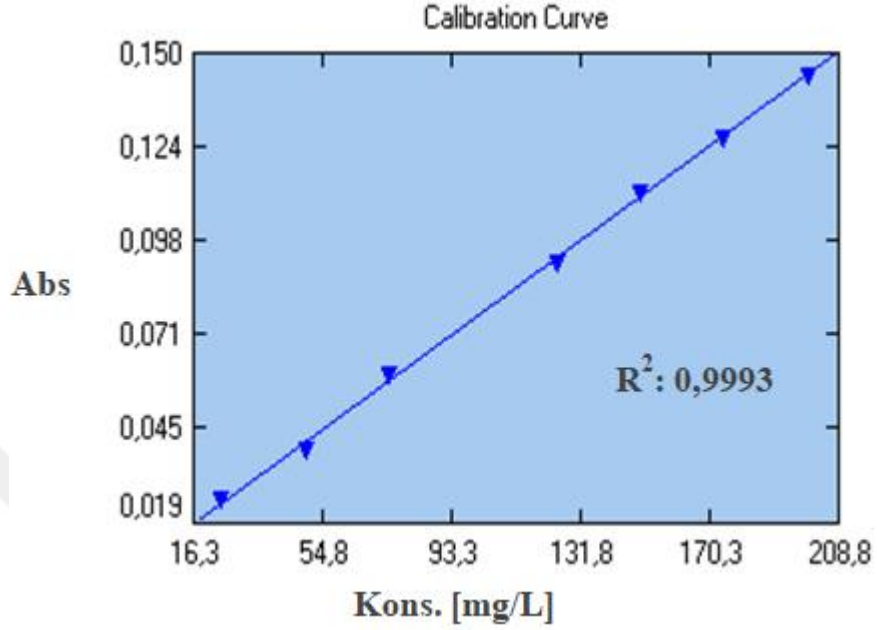
4.3. Sekonder Metabolitlerin Enstrümental Analiz Bulguları

4.3.1. Kallus Kültürlerinde Toplam Fenolik Bileşik ve Naringin Miktarı

Sekonder metabolit üretiminin araştırılması amacı ile seçilen ortamlarda gelişen kalluslara ait ekstraktlar toplam fenolik bileşik ve naringin miktar analizi için değerlendirilmiştir. Analizlerde, toplam fenolik bileşik için gallik asit ve naringin miktarı için ise standart naringin çözeltilerinin absorbansları ile konsantrasyonları kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrileri kullanılmıştır (Şekil 4.4 ve 4.5). Elde edilen sonuçlar her ekstrakt için mg/g yaş ağırlık cinsinden hesaplanmış ve meyveler (portakal ve altıntop) ayrı ayrı değerlendirilmiştir.



Şekil 4.4. Gallik Asit'e ait kalibrasyon grafiği



Şekil 4.5. Naringin'e ait kalibrasyon grafiği

Her bir meyveye ait eksplantlar (albedo ve meyve kesiti), ortamlar ve aydınlık (16/8 saat aydınlık/karanlık) ile tamamen karanlıkta gelişen kallus ekstraktlarına ait enstrümental analizler 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Varyans analizleri JMP-8 istatistik paket programı ile gerçekleştirilmiş ve farklılıklar LSD çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırılmıştır. Toplam fenolik bileşik ve naringin miktar analizlerine ait sonuçlar Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Farklı ortam ve kültür koşullarında gelişen portakal kalluslarının altkültürler boyunca toplam fenolik ve naringin miktarı

Eksplant	Alt kültür	Ortam	Toplam Fenolik Bileşik (mg/g)		Naringin (mg/g)	
			Aydınlık	Karanlık	Aydınlık	Karanlık
Albedo	1.	O1	1,421 hijk	0,548 jk	0,143 e	0,063 h
		O2	2,796 a	2,636 a	0,229 a	0,225 a
		O3	0,290 q	1,470 de	0,017 p	0,169 b
		O4	1,988 bcd	2,147 b	0,091 i	0,137 d
	2.	O1	1,056 mno	0,268 l	0,050 lmn	0,012 l
		O2	1,745 cdefg	0,506 k	0,107 h	0,030 k
		O3	0,596 pq	1,359 de	0,031 op	0,154 c
		O4	1,798 cdef	2,747 a	0,122 fg	0,096 fg
	3.	O1	1,784 cdef	0,751 ij	0,165 d	0,060 h
		O2	0,941 o	0,810 hi	0,040 no	0,031 k
		O3	2,744 a	1,688 c	0,190 c	0,064 h
		O4	2,968 a	2,010 b	0,206 b	0,113 e
	4.	O1	1,363 ijklm	-	0,064 kl	-
		O2	0,960 o	-	0,063 kl	-
		O3	1,125 kl mno	-	0,088 i	-
		O4	0,907 o	-	0,043 mno	-
Meyve kesiti	1.	O1	1,436 ghij	0,988 gh	0,089 i	0,031 k
		O2	0,998 no	0,770 i	0,058 kl	0,045 ij
		O3	1,752 cdef	0,635 ijk	0,152 de	0,052 hij
		O4	1,381 ijkl	1,019 gh	0,128 f	0,063 h
	2.	O1	1,515 fghij	1,263 ef	0,118 fgh	0,057 hi
		O2	1,297 jklmn	1,010 gh	0,081 ij	0,012 l
		O3	2,045 bc	2,093 b	0,149 e	0,155 c
		O4	1,709 defgh	1,433 de	0,117 fgh	0,084 g
	3.	O1	0,987 o	0,687 ijk	0,056 klm	0,041 jk
		O2	1,629 efghi	1,100 fg	0,111 gh	0,062 h
		O3	1,914 bcde	1,500 cd	0,116 fgh	0,093 fg
		O4	1,106 lmno	0,847 hi	0,070 jk	0,103 ef

Çizelge 4.8'in devamı

Eksplant	Altkültür	Ortam	Toplam Fenolik Bileşik (mg/g)		Naringin (mg/g)	
			Aydınlık	Karanlık	Aydınlık	Karanlık
Meyve kesiti	4.	O1	2,131 b	-	0,107 h	-
		O2	0,828 op	-	0,051 lmn	-
		O3	1,620 efghi	-	0,109 gh	-
		O4	1,429 hijk	-	0,089 i	-

Aydınlık Toplam Fenolik Bileşik: LSD eksplant: 0.07***, LSD ortam: 0.10***, LSD altkültür: 0.10***, LSD eksplant x altkültür x ortam: 0.30***, Karanlık Toplam Fenolik Bileşik: LSD eksplant: 0.06***, LSD ortam: 0.08***, LSD altkültür: 0.07***, LSD eksplant x altkültür x ortam: 0.21***, Aydınlik Naringin: LSD eksplant: 0.003***, LSD ortam: 0.005***, LSD altkültür: 0.005***, LSD eksplant x altkültür x ortam: 0.014***, Karanlık Naringin: LSD eksplant: 0.003***, LSD ortam: 0.005***, LSD altkültür: 0.004***, LSD eksplant x altkültür x ortam: 0.012***.

Portakal kallus ekstraktlarına ait toplam fenolik bileşik ve naringin miktar analiz sonuçları dikkate alındığında birçok faktörün bu değerler üzerinde etkili olduğu gözlemlenmiştir. Aydınlik kültür şartlarında çok fazla fark olmasa da fenolik bileşik yönünden en iyi eksplant kaynağının albedo (1.530 mg/g), en iyi kültür süresinin 3. altkültür ve en iyi ortamın O4 olduğu tespit edilmiştir. En düşük sonuç veren ortamın O2 ve kültür süresinin 4. altkültür olduğu gözlemlenmiştir. Benzer olarak aydınlık kültür şartlarında naringin miktarı incelendiğinde en iyi eksplantın albedo (0.103 mg/g), en iyi kültür süresinin 3. altkültür ve en iyi ortamın O4 ile O3 olduğu tespit edilmiştir. En düşük naringin miktarına sahip ortamın O2 ve kültür süresinin ise 4. altkültür olduğu belirlenmiştir. Portakal eksplantlarının aydınlık koşullarda gelişen kalluslarında, toplam fenolik bileşik ve naringin miktarı sonuçları benzerlik göstermiştir. Karanlık kültür koşullarında gelişen portakal kallusları incelendiğinde en iyi eksplant albedo (1.411 mg/g), en başarılı kültür süresi 2. ve 1. altkültür iken O4 ortamının en iyi ortam olduğu tespit edilmiştir. Naringin miktarına göre en iyi eksplant albedo (0.096 mg/g) ve ortam O3 olarak tespit edilmiştir. Kültür süresinde ise 1. altkültürün daha iyi sonuç verdiği görülmüştür.

Çizelge 4.9. Farklı ortamlar ve altkültürlerde gelişen portakal kalluslarının aydınlık ve karanlık kültür koşullarındaki fenolik bileşik ve naringin miktarı

Koşul	Altkültür	Ortam	Toplam Fenolik Bileşik (mg/g)		Naringin(mg/g)	
			Albedo	Meyve kesiti	Albedo	Meyve kesiti
Karanlık	1.	O1	0,548 klm	0,988 ijk	0,063 i	0,031 l
		O2	2,636 b	0,770 kl	0,225 a	0,045 jk
		O3	1,470 fgh	0,635 l	0,169 c	0,052 ijk
		O4	2,147 c	1,019 ij	0,137 ef	0,063 hi
	2.	O1	0,268 n	1,263 gh	0,012 m	0,057 i
		O2	0,506 lmn	1,01 ij	0,030 kl	0,012 m
		O3	1,359 h	2,093 a	0,154 cd	0,155 a
		O4	2,747 ab	1,433 efg	0,096 h	0,084 f
	3.	O1	0,751 jkl	0,687 l	0,060 i	0,041 kl
		O2	0,810 ijk	1,1 hi	0,031 kl	0,062 hi
		O3	1,688 efg	1,5 defg	0,064 i	0,093 ef
		O4	2,010 cd	0,847 jkl	0,113 g	0,103 de
Aydınlık	1.	O1	1,421 gh	1,436 efg	0,143 de	0,089 f
		O2	2,796 ab	0,998 ijk	0,229 a	0,058 hi
		O3	0,290 mn	1,752 bc	0,017 lm	0,152 a
		O4	1,988 cd	1,381 fg	0,091 h	0,128 b
	2.	O1	1,056 i	1,515 cdef	0,050 ij	0,118 bc
		O2	1,745 def	1,297 fgh	0,107 gh	0,081 fg
		O3	0,462 mn	2,045 a	0,031 kl	0,149 a
		O4	1,798 de	1,709 bcd	0,122 fg	0,117 bc
	3.	O1	1,783 de	0,987 ijk	0,165 c	0,056 ij
		O2	0,941 ij	1,629 cde	0,040 jk	0,111 cd
		O3	2,744 ab	1,914 ab	0,190 b	0,116 bc
		O4	2,968 a	1,106 hi	0,206 b	0,070 gh

Albedo Toplam Fenolik Bileşik: LSD kültür koşulu: 0.080***, LSD ortam: 0.113***, LSD altkültür: 0.098***, LSD kültür koşulu x altkültür x ortam: 0.278***, Meyve Kesiti Toplam Fenolik Bileşik: LSD kültür koşulu: 0.069***, LSD ortam: 0.097***, LSD altkültür: 0.084***, LSD kültür koşulu x altkültür x ortam: 0.239***, Albedo Naringin: LSD kültür koşulu: 0.004***, LSD ortam: 0.006***, LSD altkültür: 0.005***, LSD kültür koşulu x altkültür x ortam: 0.016***, Meyve Kesiti Naringin: LSD kültür koşulu: 0.003***, LSD ortam: 0.005***, LSD altkültür: 0.004***, LSD kültür koşulu x altkültür x ortam: 0.012***.

Portakala ait iki farklı eksplantın (albedo ve meyve kesiti) sahip olduğu toplam fenolik bileşik ve naringin miktarına, kültür koşullarının etkisi ayrıca incelenmiştir. Albedo ekstraktlarından elde edilen toplam fenolik bileşik sonuçlarına göre aydınlık kültür koşulları karanlığa göre daha iyi sonuç vermiştir. En başarılı ortamın O4, en iyi kültür süresinin ise 3. ve 1. altkültür olduğu tespit edilmiştir. Meyve kesiti kallus ekstraktlarından elde edilen fenolik sonuçlarına göre en iyi kültür koşulunun aydınlık olduğu tespit edilmiştir. Kültür süresi incelendiğinde ise 2. altkültürün diğerlerine göre daha iyi sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Ortamlar içerisinde O3 ve O4'ün fenolik bileşik yönünden diğerlerine göre daha başarılı olduğu bulunmuştur. Albedo ekstraktlarından elde edilen naringin miktarı incelendiğinde aydınlık kültür koşullarının karanlığa göre daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir. Ortamlar değerlendirildiğinde O4'ün diğerlerine göre daha başarılı ve 1. altkültürün de kültür süresi olarak en iyi olduğu bulunmuştur. Meyve kesiti eksplantı naringin miktarı yönünden değerlendirildiğinde aydınlık kültür koşullarının daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir. Ortam O3 ve O4 ile 2. altkültürün diğerlerine göre daha başarılı olduğu tespit edilmiştir. Tüm bu veriler doğrultusunda toplam fenolik bileşik ve naringin miktarı analizlerinin birbiri ile uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Her iki eksplantta da aydınlık kültür koşullarının toplam fenolik madde ve naringin miktarı bakımından daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Benzer olarak birçok araştırma ışığın metabolitler üzerinde farklı etkileri olduğunu vurgulamıştır. Carvalho ve ark. (2016) fesleğende (*O. basilicum* L.) mavi/kırmızı/sarı dalga boylarının monoterpenoid ve indirgenmiş fenilpropanoidlerin üretilmesi tetiklediğini ancak mavi/kırmızı/uzun dalga boylu kırmızı ışık uygulamasının seskiterpenoid uçucu bileşiklerin miktarını artırdığını bildirmişlerdir.

Çizelge 4.10. Farklı ortam ve kültür koşullarında gelişen altıntop kalluslarının altkültürler boyunca toplam fenolik ve naringin miktarı

Eksplant	Alt kültür	Ortam	Toplam Fenolik Bileşik (mg/g)		Naringin (mg/g)	
			Aydınlık	Karanlık	Aydınlık	Karanlık
Albedo	1.	O1	1,436 fg	2,083 e	0,276 c	0,634 a
		O2	1,594 def	3,500 a	0,090 mno	0,484 b
		O3	1,392 fg	1,804 fg	0,035 rst	0,311 e
		O4	2,381 b	2,367 d	0,117 ijk	0,384 d
	2.	O1	1,584 ef	1,989 ef	0,121 ijk	0,250 f
		O2	2,253 b	2,010 ef	0,168 fg	0,088 hi
		O3	1,801 de	3,116 b	0,201 e	0,450 c
		O4	2,955 a	2,740 c	0,224 d	0,172 g
	3.	O1	1,333 fgh	1,120 ij	0,078 no	0,052 jk
		O2	0,542 n	0,680 lm	0,035 rst	0,021 kl
		O3	0,937 jklm	0,820 kl	0,046 qrs	0,029 kl
		O4	1,435 fg	1,090 ij	0,243 d	0,188 g
	4.	O1	1,193 ghij	-	0,113 jkl	-
		O2	0,488 n	-	0,013 uv	-
		O3	0,556 n	-	0,025 tuv	-
		O4	0,987 ijkl	-	0,087 mno	-
Meyve kesiti	1.	O1	3,059 a	1,537 h	0,284 c	0,018 l
		O2	1,556 ef	2,008 ef	0,149 gh	0,158 g
		O3	3,002 a	2,933 bc	0,380 a	0,399 d
		O4	1,455 fg	2,923 bc	0,105 jklm	0,444 c
	2.	O1	0,722 lmn	0,810 kl	0,094 lmn	0,068 ij
		O2	1,09 hijk	1,480 h	0,052 qr	0,046 jkl
		O3	0,664 mn	0,530 m	0,010 v	0,156 g
		O4	1,88 cd	1,61 gh	0,074 op	0,113 h
	3.	O1	0,991 ijkl	1,150 ij	0,124 ij	0,096 hi
		O2	1,527 ef	0,920 jk	0,137 hi	0,018 l
		O3	2,103 bc	1,210 i	0,310 b	0,156 g
		O4	1,23 ghi	0,840 kl	0,184 ef	0,116 h
	4.	O1	0,540 n	-	0,057 pq	-
		O2	0,912 jklm	-	0,032 stu	-
		O3	0,770 lmn	-	0,101 klm	-
		O4	0,893 klm	-	0,030 stu	-

Aydınlık Toplam Fenolik Bileşik: LSD eksplant: 0.07***, LSD ortam: 0.10***, LSD altkültür: 0.10***, LSD eksplant x altkültür x ortam: 0.29***, Karanlık Toplam Fenolik Bileşik: LSD eksplant: 0.06***, LSD ortam: 0.09***, LSD altkültür: 0.08***, LSD eksplant x altkültür x ortam: 0.23***, Aydınlık Naringin: LSD eksplant: 0.004***, LSD ortam: 0.007***, LSD altkültür: 0.007***, LSD eksplant x altkültür x ortam: 0.007***, Karanlık Naringin: LSD eksplant: 0.009***, LSD ortam: 0.013***, LSD altkültür: 0.011***, LSD eksplant x altkültür x ortam: 0.032***.

Çizelge 4.10 verileri dikkate alındığında altıntop kallus ekstraktlarındaki toplam fenolik bileşik miktarlarına göre aydınlık kültür koşullarında albedo (1.429 mg/g) ve meyve kesiti (1.399 mg/g) eksplantlarında önemli bir fark tespit edilmemiştir. Kültür süreleri değerlendirildiğinde 1. altkültür (1.984 mg/g) en iyi sonucu verirken, 4. altkültürün (0.792 mg/g) en düşük sonucu verdiği gözlemlenmiştir. Ortamlar arasında ise O4'ün (1.651 mg/g) en yüksek fenolik bileşik değerine sahip olduğu bulunmuştur. Aydınlık kültür koşullarının aksine karanlık koşullarda eksplantlar arasında farklılık tespit edilmiş ve albedonun (1.943 mg/g) meyve kesiti eksplantına (1.495 mg/g) göre daha yüksek toplam fenolik miktarına sahip olduğu gözlemlenmiştir. Kültür sürelerine göre 1. altkültür (2.394 mg/g) ve ortamlardan ise O4'ün (1.928 mg/g) diğerlerinden daha yüksek fenolik miktarına sahip olduğu tespit edilmiştir. Kallusların naringin miktarına göre aydınlıkta çok fark olmasa da istatistiksel olarak meyve kesiti eksplantının (0.132 mg/g) albedo eksplantına (0.116 mg/g) göre daha yüksek sonuç verdiği tespit edilmiştir. Kültür süresi değerlendirildiğinde 1. altkültür (0.179 mg/g) ve O1 ortamının (0.143 mg/g) en yüksek değere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Karanlık kültür şartlarında albedo 0.255 mg/g ile meyve kesiti eksplantından (0.149 mg/g) daha yüksek değere sahip olduğu bulunmuştur. Ortam O3 (0.250 mg/g) ve 1. altkültür (0.353 mg/g) naringin miktarının diğerlerinden yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.11. Farklı ortamlar ve altkültürlerde gelişen altıntop kalluslarının aydınlık ve karanlık kültür koşullarındaki fenolik bileşik ve naringin miktarı

Koşul	Altkültür	Ortam	Toplam Fenolik Bileşik (mg/g)		Naringin (mg/g)	
			Albedo	Meyve kesiti	Albedo	Meyve kesiti
Karanlık	1.	O1	2,083 efg	1,537 d	0,634 a	0,018 n
		O2	3,500 a	2,008 b	0,484 b	0,158 de
		O3	1,804 gh	2,933 a	0,311 e	0,399 b
		O4	2,367 de	2,923 a	0,384 d	0,444 a
	2.	O1	1,989 fg	0,810 hijk	0,250 fg	0,068 klm
		O2	2,010 fg	1,480 de	0,088 lm	0,046 m
		O3	3,116 b	0,530 k	0,450 c	0,156 e
		O4	2,740 c	1,610 cd	0,172 ij	0,113 ghi
	3.	O1	1,120 jkl	1,150 fg	0,052 no	0,096 ij
		O2	0,680 no	0,920 ghij	0,021 p	0,018 n
		O3	0,820 mno	1,210 ef	0,029 op	0,156 e
		O4	1,090 klm	0,840 hij	0,188 ij	0,116 ghi
Aydınlık	1.	O1	1,436 i	3,059 a	0,276 f	0,284 c
		O2	1,594 hi	1,556 d	0,090 lm	0,149 ef
		O3	1,392 ij	3,002 a	0,035 op	0,380 b
		O4	2,381 d	1,455 de	0,117 kl	0,105 hi
	2.	O1	1,584 hi	0,722 ijk	0,121 k	0,094 ijk
		O2	2,253 def	1,090 fgh	0,168 j	0,052 lm
		O3	1,801 gh	0,664 jk	0,201 hi	0,010 n
		O4	2,955 bc	1,880 bc	0,224 gh	0,074 jkl
	3.	O1	1,333 ijk	0,991 fghi	0,078 mn	0,124 fgh
		O2	0,542 o	1,527 d	0,035 op	0,137 efg
		O3	0,937 lmn	2,103 b	0,046 op	0,310 c
		O4	1,435 i	1,230 ef	0,243 g	0,184 d

Albedo Toplam Fenolik Bileşik: LSD kültür koşulu: 0.083***, LSD ortam: 0.118***, LSD altkültür: 0.102***, LSD kültür koşulu x altkültür x ortam: 0.289***, Meyve Kesiti Toplam Fenolik Bileşik: LSD kültür koşulu: 0.082***, LSD ortam: 0.116***, LSD altkültür: 0.100***, LSD kültür koşulu x altkültür x ortam: 0.284***, Albedo Naringin: LSD kültür koşulu: 0.008***, LSD ortam: 0.012***, LSD altkültür: 0.010***, LSD kültür koşulu x altkültür x ortam: 0.030***, Meyve Kesiti Naringin: LSD kültür koşulu: 0.007***, LSD ortam: 0.010***, LSD altkültür: 0.009***, LSD kültür koşulu x altkültür x ortam: 0.026***.

Çizelge 4.11’de altıntop eksplantlarından gelişen kallusların sahip olduğu naringin ve toplam fenolik bileşik miktarı üzerinde kültür koşullarının etkisi ayrıca değerlendirilmiştir. Albedo eksplantları değerlendirildiğinde karanlık kültür koşullarının (1.943 mg/g) aydınlığa (1.636 mg/g) göre daha başarılı olduğu gözlemlenmiştir. Ortam O4 (2.161 mg/g) ve 2. altkültürün (2.305 mg/g) diğerlerine göre daha yüksek fenolik bileşik değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Meyve kesiti eksplantları toplam fenolik bileşik miktarına göre değerlendirildiğinde aydınlık kültür koşullarının (1.606 mg/g) karanlığa (1.495 mg/g) göre daha yüksek değere sahip olduğu bulunmuştur. Ortam O3 (1.740 mg/g) ve O4 (1.656 mg/g) ile 1. altkültürde (2.309 mg/g) daha yüksek fenolik bileşik değeri tespit edilmiştir. Albedo eksplantı naringin miktarına göre değerlendirildiğinde karanlık (0.255 mg/g) kültür koşullarının aydınlığa (0.136 mg/g) göre daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Kültür süresi 1. altkültür (0.291 mg/g) ve ortam O1 (0.235 mg/g) ile O4’ün (0.221 mg/g) en yüksek değerlere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Meyve kesiti eksplantlarında aydınlık koşulların (0.158 mg/g) karanlığa (0.149 mg/g) göre daha yüksek naringin miktarına sahip olduğu bulunmuştur. Ortam O3 (0.235 mg/g) ile O4’ün (0.172 mg/g) en iyi ortam, 1. altkültürün (0.242 mg/g) ise en iyi kültür süresi olduğu tespit edilmiştir.

Portakala (‘Washington Navel’) ait farklı dokuların kallus oluşturma kabiliyetlerini araştırmak amacı ile Amo-Marco (1997) kallus kültürü çalışmaları yürütmüştür. Eksplant kaynağı olarak albedo (mezokarp) ve usare (endokarp) kullanılarak kallus oluşturma kapasiteleri araştırılmıştır. Kinetin, gibberellik asit (GA₃) ve 2,4D içeren Murashige and Tucker (1969) ortamı kullanılmıştır. Her iki meyve dokusundan kallus oluştuğu ve albedo dokusunun daha iyi kallus oluşturduğu tespit edilmiştir. Ek olarak bitki büyüme düzenleyiciler olmadan da albedonun %100 kallus oluşturduğu bildirilmiştir. Buna benzer olarak tez çalışmaları kapsamında da her iki meyveye ait albedo eksplantları, kallus oluşumu ve sekonder metabolit üretimi yönünden oldukça başarılı sonuçlar vermiştir. Her iki bitkisel materyal ile onlara ait eksplantlardan elde edilen kallusların

enstrümantal analiz sonuçları ve istatistik verileri detaylı olarak incelendiğinde albedo eksplantının meyve kesiti eksplantına göre daha yüksek toplam fenolik ve naringin miktarına sahip olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak aydınlık kültür koşullarının da karanlık kültür koşullarına göre daha iyi olduğu belirlenmiştir. Gao ve ark. (2011) turuncgillerde karotenoidlerin biyosentezinde aydınlık ve karanlığın etkisini araştırmışlardır. Yaptıkları kallus kültürü çalışmalarında Red Marsh altıntop (*C. paradisi* Macf.) kalluslarında beyaz ışığın karotenoid biyosentezini engellerken Tarocco kan portakalı (*C. sinensis* (L.) Osbeck) kalluslarında %55'in üzerinde karotenoid biriktirdiğini belirtmişlerdir. Karotenoidlerin biyosentezinde ışığın olumlu ya da olumsuz etkileri olabileceğini öne sürmüşler ve kallus kültürü çalışmalarında genotipin de etkili olabileceğini bildirmişlerdir.

Farklı konsantrasyonlardaki bitki büyüme düzenleyicileri ile hazırlanan ortamlar arasında O4 ortamının diğerlerine göre daha başarılı olduğu bulunmuştur. Bitkisel materyallerden ise altıntopun portakala kıyasla toplam fenolik ve naringin miktarının daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.

4.3.1.1. Elisitör Uygulamalarının Toplam Fenolik Bileşik ve Naringin Miktarı Üzerindeki Etkileri

Kalluslarda sekonder metabolit üretimini artırmak amacı ile besi ortamına ek olarak bazı elisitör uygulamaları yapılmıştır. Hem kallus gelişimi hem de enstrümantal analiz sonuçları dikkate alınarak elisitör uygulamaları için O3 ortamının daha uygun olduğu tespit edilmiş ve kontrol ortamı olarak kullanılmıştır. O3 ortamının içerdiği sakkaroz miktarı (30 g/L) değiştirilerek yeni sakkaroz denemeleri (20-40 g/L) yapılmıştır. Diğer elisitör uygulaması olan metil jasmonat için de O3 ortamı kullanılmış ve farklı konsantrasyonlar (0-7.5-10 µM) kullanılarak gerçekleştirilen denemelere ait enstrümantal analiz sonuçları değerlendirilmiştir. Elisitör uygulamalarına ek olarak aydınlık ve karanlık kültür şartları tüm denemelere dâhil edilmiştir.

Kallus kültürlerinde sekonder metabolitlerin üretim miktarını artırmak amacı ile uygulanan elisitör çalışmalarına örnek olarak Mahyuni (1999)'nin yaptığı araştırmada *Citrus aurantifolia*'nın kallus kültürlerini kullanılmıştır. Araştırmacı, kallus kültürlerinde elisitör olarak farklı konsantrasyonlarda [0.5, 1.0 ve 2.0 g/L, (w/v)] maya ekstraktını kullanmıştır. Önemli flavonoidlerden olan hesperetin ve kuersetinin biyolojik üretimi üzerinde maya ekstraktının herhangi bir etkisi olmadığını tespit etmiştir. Elde ettiği sonuçlar doğrultusunda, *C. aurantifolia*'nın kallus kültürlerinde, kuersetin ve hesperetin üretimini arttırmak için maya ekstraktının uygun bir elisitör olmayacağını öne sürmüştür. Farklı olarak tez çalışmalarında kullanılan tüm elisitör uygulamalarının olumlu ya da olumsuz etki gösterdikleri tespit edilmiş olup etkisi olmayan bir uygulama gözlemlenmemiştir. Farklı bir uygulama olarak Amo-Marco (1997) çalışmasında bitki büyüme düzenleyicileri ile tek başına ya da farklı kombinasyonlarla ortama eklenen portakal suyunun kallus oluşumuna etkisi araştırmıştır. Bitki büyüme düzenleyicilerinin olmadığı ve %15 portakal suyu ilave edilen ortamlarda albedoda kallus büyümesinde artış tespit edilmiştir. Hem albedo hem de usare dokularında maksimum kallus oluşumunun %15 portakal suyu ve 10 µM 2,4D içeren ortamlarda olduğu sonucuna varılmıştır. Portakal suyunun kallus gelişiminde yüksek uyarıcı etkiye sahip olduğu ve bu etkinin 2,4D'nin eklenmesine bağlı olabileceğini vurgulamıştır.

Çizelge 4.12. Portakal kalluslarında farklı sakkaroz uygulamalarının toplam fenolik bileşik ve naringin miktarı üzerine etkisi

Eksplant	Altkültür	Ortam	Toplam Fenolik Bileşik (mg/g)		Naringin (mg/g)	
			Aydınlık	Karanlık	Aydınlık	Karanlık
Albedo	1	O3	0,290 o	1,470 def	0,017 o	0,169 b
		S1	1,958 cd	1,173 gh	0,132 de	0,122 c
		S2	0,391 o	0,836 i	0,015 o	0,086 d
	2	O3	0,463 o	1,359 ef	0,031 n	0,154 b
		S1	1,806 def	1,756 b	0,110 fg	0,161 b
		S2	2,537 b	2,023 a	0,062 jk	0,229 a
	3	O3	2,744 a	1,655 bc	0,190 a	0,064 ef
		S1	1,191 jkl	1,550 cd	0,107 g	0,121 c
		S2	0,711 n	1,156 h	0,073 ij	0,243 a
	4	O3	1,125 klm	-	0,088 h	-
		S1	1,188 jkl	-	0,079 hi	-
		S2	1,014 lm	-	0,054 kl	-
Meyve kesiti	1	O3	1,752 efg	0,636 j	0,152 bc	0,052 fg
		S1	1,009 lm	1,316 fg	0,062 jk	0,053 fg
		S2	1,526 hi	0,723 ij	0,162 b	0,055 f
	2	O3	2,045 c	2,093 a	0,149 bc	0,155 b
		S1	0,964 m	0,880 i	0,046 lm	0,038 g
		S2	1,377 ij	0,440 k	0,121 ef	0,015 h
	3	O3	1,918 cde	1,500 cde	0,116 fg	0,093 d
		S1	1,227 jk	0,660 j	0,075 hij	0,051 fg
		S2	1,671 fgh	0,820 i	0,139 cd	0,078 de
	4	O3	1,687 fgh	-	0,109 fg	-
		S1	1,560 ghi	-	0,035 mn	-
		S2	1,328 j	-	0,048 lm	-

Aydınlık Toplam Fenolik Bileşik: LSD eksplant: 0.055***, LSD ortam: 0.068***, LSD altkültür: 0.078***, LSD eksplant x altkültür x ortam: 0.192***, Karanlık Toplam Fenolik Bileşik: LSD eksplant: 0.052***, LSD ortam: 0.064***, LSD altkültür: 0.064***, LSD eksplant x altkültür x ortam: 0.158***, Aydınlık Naringin: LSD eksplant: 0.003***, LSD ortam: 0.004***, LSD altkültür: 0.005***, LSD eksplant x altkültür x ortam: 0.013***, Karanlık Naringin: LSD eksplant: 0.005***, LSD ortam: 0.006***, LSD altkültür: 0.006***, LSD eksplant x altkültür x ortam: 0.015***.

Sakkaroz uygulaması yapılan portakal denemelerine ait sonuçlara göre aydınlık kültür koşullarında meyve kesiti eksplantının (1.505 mg/g) albedo (1.284 mg/g) eksplantına göre daha yüksek toplam fenolik bileşik miktarına sahip olduğu tespit edilmiştir. Ortamlar arasında O3'ün (1.502 mg/g) diğerlerine göre daha yüksek değere sahip olduğu ve diğer iki ortam arasında önemli bir fark olmadığı bulunmuştur. Kültür süresinde 3. (1.577 mg/g) ve 2. altkültürün (1.531 mg/g) diğerlerine göre daha yüksek fenolik bileşik miktarına sahip olduğu gözlemlenmiştir. Karanlık kültür koşullarında albedo eksplantının (1.441 mg/g) meyve kesiti eksplantına (1.007 mg/g) göre fenolik bileşik miktarı daha yüksek bulunmuştur. Ortamlar içerisinde O3 (1.452 mg/g) ortamının ve kültür sürelerine göre de 2. altkültürün (1.425 mg/g) diğerlerinden daha yüksek değere sahip olduğu tespit edilmiştir. Naringin miktarına göre ise aydınlık kültür koşullarında meyve kesiti eksplantının (0.101 mg/g) albedo eksplantından (0.079 mg/g) daha yüksek değere sahip olduğu bulunmuştur. Ortam O3 (0.106 mg/g) ve 3. altkültürün (0.116 mg/g) diğerlerine göre daha yüksek değerde olduğu gözlemlenmiştir. Karanlık kültür koşullarında 0.149 mg/g yaş ağırlık naringin miktarına sahip albedo eksplantının meyve kesiti eksplantından (0.065 mg/g) daha yüksek değerde olduğu bulunmuştur. Ortam S2 (0.117 mg/g) ile O3'ün (0.117 mg/g) ve 2. altkültürün (0.125 mg/g) diğerlerinden daha yüksek naringin miktarına sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.13. Portakal kalluslarında farklı sakkaroz uygulamaları ile kültür koşullarının toplam fenolik bileşik ve naringin miktarı üzerine etkisi

Koşul	Altkültür	Ortam	Toplam Fenolik Bileşik (mg/g)		Naringin (mg/g)	
			Albedo	Meyve kesiti	Albedo	Meyve kesiti
Karanlık	1	O1	1,470 fg	0,636 l	0,169 c	0,052 gh
		S1	1,173 hi	1,316 g	0,122 de	0,053 gh
		S2	0,836 j	0,723 jkl	0,086 f	0,055 gh
	2	O1	1,359 gh	2,093 a	0,154 c	0,155 ab
		S1	1,756 e	0,880 hij	0,161 c	0,038 i
		S2	2,023 c	0,440 m	0,229 a	0,015 j
	3	O1	1,655 ef	1,500 ef	0,064 g	0,093 e
		S1	1,550 f	0,660 kl	0,121 de	0,051 gh
		S2	1,156 i	0,820 ijk	0,243 a	0,078 f
Aydınlık	1	O1	0,290 k	1,752 cd	0,017 h	0,152 ab
		S1	1,958 cd	1,009 h	0,132 d	0,062 g
		S2	0,391 k	1,526 ef	0,015 h	0,162 a
	2	O1	0,463 k	2,045 ab	0,031 h	0,149 bc
		S1	1,806 de	0,964 hi	0,110 e	0,046 hi
		S2	2,537 b	1,377 fg	0,161 g	0,121 d
	3	O1	2,744 a	1,918 bc	0,190 b	0,116 d
		S1	1,191 hi	1,227 g	0,107 e	0,075 f
		S2	0,711 j	1,671 de	0,073 fg	0,139 c

Albedo Toplam Fenolik Bileşik: LSD kültür koşulu: 0.062***, LSD ortam: 0.076***, LSD altkültür: 0.076***, LSD kültür koşulu x altkültür x ortam: 0.186***, Meyve Kesiti Toplam Fenolik Bileşik: LSD kültür koşulu: 0.057***, LSD ortam: 0.070***, LSD altkültür: 0.070***, LSD kültür koşulu x altkültür x ortam: 0.173***, Albedo Naringin: LSD kültür koşulu: 0.005***, LSD ortam: 0.007***, LSD altkültür: 0.007***, LSD kültür koşulu x altkültür x ortam: 0.017***, Meyve Kesiti Naringin: LSD kültür koşulu: 0.004***, LSD ortam: 0.005***, LSD altkültür: 0.005***, LSD kültür koşulu x altkültür x ortam: 0.012***.

Portakal eksplantları ayrı ayrı değerlendirildiğinde, albedo eksplantında karanlık kültür koşullarının (1.441 mg/g) aydınlık (1.343 mg/g) kültür koşullarına göre fenolik bileşik miktarı bakımından daha yüksek değerde olduğu tespit edilmiştir. Ortam S1'in (1.572 mg/g) diğer ortamlardan daha yüksek değerde olduğu ve onların da kendi aralarında bir fark olmadığı belirlenmiştir. İdeal altkültür süresinin ise 2. altkültür (1.657 mg/g) olduğu gözlemlenmiştir. Albedo

eksplantı naringin miktarına göre değerlendirildiğinde karanlık (0.149 mg/g) kültür koşullarının aydınlığa (0.081 mg/g) göre daha yüksek değerde olduğu tespit edilmiştir. Ortam S1 (0.125 mg/g) ve 3. altkültürün (0.133 mg/g) daha yüksek naringin miktarına sahip olduğu bulunmuştur. Meyve kesiti eksplantı fenolik bileşik miktarı yönünden değerlendirildiğinde aydınlık kültür koşullarının (1.498 mg/g) karanlığa (1.007 mg/g) göre daha yüksek sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Kültür süresi bakımından 2. altkültür (1.300 mg/g) ile 3. altkültür (1.299 mg/g) ve O3 (1.657 mg/g) ortamının daha yüksek fenolik bileşik miktarı içerdiği belirlenmiştir. Naringin miktarına göre meyve kesiti eksplantında aydınlık koşulların (0.113 mg/g) karanlık koşullardan (0.065 mg/g) daha yüksek değere sahip olduğu bulunmuştur. Ortam O3'ün (0.119 mg/g) daha yüksek değere sahip olduğu ve kültür süreleri arasında önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.13).

Altıntop eksplantları ile yapılan sakkaroz uygulaması çalışmalarında, aydınlık kültür koşullarında albedo eksplantına (1.571 mg/g) ait toplam fenolik bileşik miktarı meyve kesiti eksplantına (1.261 mg/g) ait miktardan daha yüksek bulunmuştur. Ortam S1'in (1.870 mg/g) diğer ortamlardan daha yüksek ve kültür süresi bakımından bütün altkültürler birbirinden farklı olup 1. altkültürün (2.07 mg/g) en yüksek değere sahip olduğu tespit edilmiştir. Karanlık kültür koşullarında ise albedo (1.491 mg/g) ve meyve kesiti eksplantları (1.481 mg/g) toplam fenolik bileşik miktarları arasında bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. O3 (1.735 mg/g) ortamının diğer ortamlardan ve kültür süresi olarak 1. altkültürün (2.231 mg/g) de diğerlerinden yüksek değerde olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.14. Altıntop kalluslarında farklı sakkaroz uygulamalarının toplam fenolik bileşik ve naringin miktarı üzerine etkisi

Eksplant	Altkültür	Ortam	Toplam Fenolik Bileşik (mg/g)		Naringin (mg/g)	
			Aydınlık	Karanlık	Aydınlık	Karanlık
Albedo	1	O3	1,392 f	1,804 c	0,035 j	0,169 d
		S1	2,448 c	1,163 d	0,243 c	0,122 e
		S2	2,018 de	1,688 c	0,133 ef	0,086 fg
	2	O3	1,801 e	3,116 a	0,201 d	0,154 d
		S1	1,279 fg	0,840 e	0,073 i	0,161 d
		S2	1,325 f	1,654 c	0,112 fg	0,229 c
	3	O3	0,937 hi	0,820 e	0,046 j	0,064 g
		S1	4,188 a	1,720 c	0,294 b	0,121 e
		S2	0,830 hij	0,530 fg	0,143 e	0,243 c
	4	O3	0,556 jk	-	0,025 jk	-
		S1	1,320 f	-	0,109 gh	-
		S2	0,762 hij	-	0,033 j	-
Meyve kesiti	1	O3	3,002 b	2,933 ab	0,380 a	0,399 a
		S1	2,568 c	2,883 b	0,257 c	0,281 b
		S2	1,010 gh	2,921 ab	0,089 hi	0,000 i
	2	O3	0,664 ijk	0,530 fg	0,010 k	0,156 d
		S1	1,034 gh	0,910 e	0,072 i	0,093 f
		S2	0,801 hij	0,710 ef	0,046 j	0,038 h
	3	O3	2,103 d	1,210 d	0,310 b	0,156 d
		S1	1,320 f	0,880 e	0,152 e	0,083 fg
		S2	0,445 k	0,445 g	0,072 i	0,125 e
	4	O3	0,770 hij	-	0,101 gh	-
		S1	0,810 hij	-	0,116 fg	-
		S2	0,610 jk	-	0,027 jk	-

Aydınlık Toplam Fenolik Bileşik: LSD eksplant: 0.079***, LSD ortam: 0.097***, LSD altkültür: 0.112***, LSD eksplant x altkültür x ortam: 0.275***, Karanlık Toplam Fenolik Bileşik: LSD eksplant: 0.072***, LSD ortam: 0.089***, LSD altkültür: 0.089***, LSD eksplant x altkültür x ortam: 0.218***, Aydınlık Naringin: LSD eksplant: 0.006***, LSD ortam: 0.007***, LSD altkültür: 0.008***, LSD eksplant x altkültür x ortam: 0.021***, Karanlık Naringin: LSD eksplant: 0.007***, LSD ortam: 0.009***, LSD altkültür: 0.009***, LSD eksplant x altkültür x ortam: 0.022***.

Altıntop eksplant verileri naringin sonuçlarına göre değerlendirildiğinde aydınlık kültür koşullarında meyve kesiti (0.135 mg/g) eksplantının albedo (0.120 mg/g) eksplantından daha yüksek değere sahip olduğu belirlenmiştir. Ortam S1'in

(0.164 mg/g) ve 1. altkültürün daha yüksek naringin miktarına sahip olduğu gözlemlenmiştir. Karanlık kültür koşullarında albedo (0.149 mg/g) ve meyve kesiti (0.147 mg/g) eksplantları arasında önemli bir fark gözlemlenmemiştir. Ortam O3 (0.183 mg/g) ve 1. altkültürün (0.176 mg/g) daha yüksek naringin miktarlarına sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.15. Altıntop kalluslarında farklı sakkaroz uygulamaları ile kültür koşullarının toplam fenolik bileşik ve naringin miktarı üzerine etkisi

Koşul	Altkültür	Ortam	Toplam Fenolik Bileşik (mg/g)		Naringin (mg/g)	
			Albedo	Meyve kesiti	Albedo	Meyve kesiti
Karanlık	1	O3	1,804 de	2,933 a	0,169 d	0,399 a
		S1	1,163 gh	2,883 a	0,122 gh	0,281 c
		S2	1,688 e	2,921 a	0,086 i	0,000 h
	2	O3	3,116 b	0,530 hi	0,154 def	0,156 d
		S1	0,840 i	0,910 fg	0,161 de	0,093 f
		S2	1,654 ef	0,710 ef	0,229 b	0,038 g
	3	O3	0,820 i	1,210 de	0,064 jk	0,156 d
		S1	1,720 e	0,880 fg	0,121 gh	0,083 f
		S2	0,530 j	0,445 i	0,243 b	0,125 e
Aydınlık	1	O3	1,392 fg	3,002 a	0,035 l	0,380 a
		S1	2,448 c	2,568 b	0,243 b	0,257 c
		S2	2,018 d	1,010 ef	0,133 fg	0,089 f
	2	O3	1,801 de	0,664 ghi	0,201 c	0,01 h
		S1	1,279 g	1,034 ef	0,073 ij	0,072 f
		S2	1,325 g	0,801 fgh	0,112 h	0,046 g
	3	O3	0,937 hi	2,103 c	0,046 kl	0,310 b
		S1	4,188 a	1,320 d	0,294 a	0,152 d
		S2	0,830 i	0,445 i	0,143 ef	0,072 f

Albedo Toplam Fenolik Bileşik: LSD kültür koşulu: 0.089***, LSD ortam: 0.109***, LSD altkültür: 0.109***, LSD kültür koşulu x altkültür x ortam: 0.267***, Meyve Kesiti Toplam Fenolik Bileşik: LSD kültür koşulu: 0.092***, LSD ortam: 0.113***, LSD altkültür: 0.113***, LSD kültür koşulu x altkültür x ortam: 0.277***, Albedo Naringin: LSD kültür koşulu: 0.006***, LSD ortam: 0.008***, LSD altkültür: 0.005***, LSD kültür koşulu x altkültür x ortam: 0.020***, Meyve Kesiti Naringin: LSD kültür koşulu: 0.008***, LSD ortam: 0.005***, LSD altkültür: 0.010***, LSD kültür koşulu x altkültür x ortam: 0.025***.

Altıntop eksplantları üzerinde kültür şartları değerlendirildiğinde, albedo eksplantında aydınlık (1.802 mg/g) kültür koşullarının karanlık kültür koşullarına (1.481 mg/g) göre daha yüksek fenolik bileşik miktarına sahip olduğu tespit edilmiştir. Kültür süresi 1. altkültür (1.752 mg/g) ile 2. altkültür (1.669 mg/g) ve ortam S1'in (1.939 mg/g) daha yüksek fenolik bileşik içerdiği gözlemlenmiştir. Meyve kesiti eksplantlarının toplam fenolik bileşik miktarı incelendiğinde karanlık koşullar (1.491 mg/g) ve aydınlık koşullar (1.438 mg/g) arasında önemli bir fark belirlenmemiştir. Ortam O3 (1.740 mg/g) ve 1. altkültürün (2.552 mg/g) diğerlerinden daha yüksek bir sonuç verdiği tespit edilmiştir. Naringin miktarı incelendiğinde ise albedo eksplantında karanlık (0.149 mg/g) kültür koşullarının aydınlığa (0.142 mg/g) göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Kültür süresi olarak 2. (0.154 mg/g) ile 3. (0.151 mg/g) altkültürün daha yüksek naringin miktarına sahip olduğu ve aralarında istatistiksel olarak önemli bir farkın olmadığı gözlemlenmiştir. Ortam S1'in (0.168 mg/g) ise diğer ortamlara göre daha yüksek naringin miktarına sahip olduğu tespit edilmiştir. Meyve kesiti eksplantında ise aydınlık (0.154 mg/g) ve karanlık (0.147 mg/g) kültür koşulları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edilememiştir. Ortam O3 (0.235 mg/g) ve 1. altkültürün (0.234 mg/g) daha yüksek naringin miktarına sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.15).

Elde edilen toplam fenolik ve naringin miktarına ait veriler değerlendirildiğinde her iki bitkisel materyal için de albedo eksplantının ve aydınlık kültür koşullarının daha yüksek sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Sakkaroz uygulamaları ile hazırlanan ortamlar arasında en yüksek değerler O3 ile S1 ortamlarında tespit edilmiştir. Albedo eksplantları ve aydınlık kültür koşulları beraber değerlendirildiğinde S1 ortamının daha iyi sonuç verdiği saptanmıştır. İdeal kültür süreleri değerlendirildiğinde portakal eksplantları için 2. ve 3. altkültürlerinin ve altıntop eksplantları için ise 1. altkültürlerinin daha yüksek fenolik bileşik ve naringin miktarına sahip olduğu belirlenmiştir. Tez kapsamında yürütülen sakkaroz uygulamalarına benzer olarak Zahedzadeh ve ark. (2015)

elmada (*Malus pumila* var. *Niedzwetzkyana*) antosiyanin üretimi için farklı konsantrasyonlarda sakkaroz, glikoz, fruktoz, maltoz, mannitol ve magnezyum dâhil olmak üzere birçok etkeni kallus kültürü çalışmalarında kullanmışlardır. Antosiyanin üretimi için en etkili uygulamanın %3 mannitol + %3 sukroz olduğunu tespit etmişlerdir.

Metil jasmonat uygulaması ile yapılan portakal kallus kültürlerine ait toplam fenolik bileşik verileri aydınlık kültür koşulları için değerlendirildiğinde meyve kesiti eksplantının (2.056 mg/g) albedodan (1.761 mg/g) daha yüksek miktara sahip olduğu saptanmıştır. Ortam MJ2 ve 3. altkültürün daha yüksek değerde olduğu gözlemlenmiştir. Karanlık kültür koşullarında ise albedonun (1.675 mg/g) meyve kesiti eksplantından (1.373 mg/g) daha yüksek miktara sahip olduğu belirlenmiştir. Aydınlık koşullara benzer olarak MJ2 ortamının (1.648 mg/g) en yüksek değere sahip olduğu bulunmuş ve 2. altkültürün (1.795 mg/g) diğerlerinden daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir. Aydınlık kültür koşullarında naringin miktarı değerlendirildiğinde meyve kesiti eksplantının (0.132 mg/g) albedodan (0.111 mg/g) daha yüksek değere sahip olduğu bulunmuştur. Ortam MJ2 (0.161 mg/g) ve 3. altkültürün (0.168 mg/g) diğerlerine göre daha fazla naringin miktarına sahip olduğu görülmüştür. Karanlık kültür koşullarına göre ise albedo (0.119 mg/g) eksplantının meyve kesitinden (0.093 mg/g) daha yüksek değerde naringin içerdiği saptanmıştır. Ortam MJ2 (0.122 mg/g) ve 2. altkültürün (0.125 mg/g) diğerlerine göre daha yüksek miktarda olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16. Portakal kalluslarında metil jasmonat uygulamalarının toplam fenolik bileşik ve naringin miktarı üzerine etkisi

Eksplant	Altkültür	Ortam	Toplam Fenolik Bileşik (mg/g)		Naringin (mg/g)	
			Aydınlık	Karanlık	Aydınlık	Karanlık
Albedo	1	O3	0,290 i	1,470 fg	0,017 m	0,169 b
		MJ1	2,052 d	1,143 h	0,128 ef	0,027 k
		MJ2	1,890 def	1,720 de	0,143 de	0,104 fgh
	2	O3	0,463 i	1,359 g	0,031 m	0,154 c
		MJ1	1,963 de	1,530 efg	0,121 fg	0,094 ghi
		MJ2	2,590 c	2,040 bc	0,097 ijk	0,127 de
	3	O3	2,744 c	1,655 ef	0,190 c	0,064 j
		MJ1	1,117 gh	1,896 cd	0,102 hij	0,113 ef
		MJ2	3,120 b	2,27 a	0,241 b	0,221 a
	4	O3	1,125 gh	-	0,088 jkl	-
		MJ1	1,210 g	-	0,081 kl	-
		MJ2	2,570 c	-	0,103 hij	-
Meyve kesiti	1	O3	1,752 ef	0,636 i	0,152 d	0,052 j
		MJ1	1,040 gh	1,048 h	0,087 jkl	0,033 k
		MJ2	4,878 a	0,721 i	0,150 d	0,087 i
	2	O3	2,045 d	2,093 abc	0,149 d	0,155 bc
		MJ1	2,030 d	2,13 ab	0,092 ijk	0,136 d
		MJ2	2,100 d	1,620 ef	0,182 c	0,086 i
	3	O3	1,918 def	1,500 fg	0,116 fgh	0,093 hi
		MJ1	1,729 ef	1,091 h	0,101 ghi	0,095 ghi
		MJ2	2,612 c	1,520 efg	0,260 a	0,108 fg
	4	O3	1,687 f	-	0,109 ghi	-
		MJ1	0,930 h	-	0,073 l	-
		MJ2	1,960 def	-	0,117 fgh	-

Aydınlık Toplam Fenolik Bileşik: LSD eksplant: 0.079***, LSD ortam: 0.097***, LSD altkültür: 0.112***, LSD eksplant x altkültür x ortam: 0.274***, Karanlık Toplam Fenolik Bileşik: LSD eksplant: 0.069***, LSD ortam: 0.085***, LSD altkültür: 0.085***, LSD eksplant x altkültür x ortam: 0.208***, Aydınlik Naringin: LSD eksplant: 0.005***, LSD ortam: 0.006***, LSD altkültür: 0.007***, LSD eksplant x altkültür x ortam: 0.017***, Karanlık Naringin: LSD eksplant: 0.004***, LSD ortam: 0.005***, LSD altkültür: 0.009***, LSD eksplant x altkültür x ortam: 0.014***.

Çizelge 4.17. Portakal kalluslarında metil jasmonat uygulamaları ile kültür koşullarının toplam fenolik bileşik ve naringin miktarı üzerine etkisi

Koşul	Altkültür	Ortam	Toplam Fenolik Bileşik (mg/g)		Naringin (mg/g)	
			Albedo	Meyve kesiti	Albedo	Meyve kesiti
Karanlık	1	O3	1,470 gh	0,636 g	0,169 d	0,052 h
		MJ1	1,143 i	1,048 f	0,027 l	0,033 i
		MJ2	1,720 efg	0,721 g	0,104 hij	0,087g
	2	O3	1,359 hi	2,093	0,154 de	0,155 c
		MJ1	1,530 gh	2,13 c	0,094 j	0,136 d
		MJ2	2,040 cd	1,620 e	0,127 fg	0,086 i
	3	O3	1,655 fg	1,500 e	0,064 k	0,093 fg
		MJ1	1,896 def	1,091	0,113 ghi	0,095 fg
		MJ2	2,270 c	1,520 e	0,221 b	0,108 ef
Aydınlık	1	O3	0,290 j	1,752 de	0,017 l	0,152 c
		MJ1	2,052 cd	1,04 f	0,128 fg	0,087 g
		MJ2	1,890 def	4,878 a	0,143 ef	0,150 cd
	2	O3	0,463 j	2,045 c	0,031 l	0,149 cd
		MJ1	1,963 de	2,03 c	0,121 gh	0,092 g
		MJ2	2,590 b	2,1 c	0,097 ij	0,182 b
	3	O3	2,744 b	1,918 cd	0,190 c	0,116 e
		MJ1	1,117 i	1,729 de	0,102 ij	0,101 efg
		MJ2	3,120 a	2,612 b	0,241 a	0,260 a

Albedo Toplam Fenolik Bileşik: LSD kültür koşulu: 0.083***, LSD ortam: 0.102***, LSD altkültür: 0.102***, LSD kültür koşulu x altkültür x ortam: 0.251***, Meyve Kesiti Toplam Fenolik Bileşik: LSD kültür koşulu: 0.085***, LSD ortam: 0.104***, LSD altkültür: 0.104***, LSD kültür koşulu x altkültür x ortam: 0.255***, Albedo Naringin: LSD kültür koşulu: 0.005***, LSD ortam: 0.007***, LSD altkültür: 0.007***, LSD kültür koşulu x altkültür x ortam: 0.017***, Meyve Kesiti Naringin: LSD kültür koşulu: 0.005***, LSD ortam: 0.006***, LSD altkültür: 0.006***, LSD kültür koşulu x altkültür x ortam: 0.015***.

Portakal eksplantları üzerinde kültür şartları toplam fenolik bileşik miktarına göre değerlendirildiğinde albedo eksplantında aydınlık (1.803 mg/g) kültür koşullarının karanlığa (1.675 mg/g) göre daha yüksek değerde olduğu tespit edilmiştir. MJ2 (2.271 mg/g) ortamı ve kültür süresi olarak 3. altkültürün (2.133 mg/g) yüksek miktarda fenolik bileşik miktarına sahip olduğu görülmüştür. Meyve kesiti eksplantına ait sonuçlar değerlendirildiğinde aydınlık (2.233 mg/g) koşulların karanlığa (1.373 mg/g) göre daha iyi sonuç verdiği gözlenmiştir. Ortam MJ2 (2.241 mg/g) ile 2. altkültürün (2.003 mg/g) daha yüksek miktarda fenolik bileşik içerdiği belirlenmiştir. Naringin miktarına göre albedo eksplantı değerlendirildiğinde aydınlık (0.119 mg/g) ve karanlık (0.118 mg/g) koşullar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmemiştir. Ortam MJ2 (0.155 mg/g) ile 3. altkültüre (0.155 mg/g) ait naringin miktarının daha yüksek olduğu saptanmıştır. Meyve kesiti eksplantına göre değerlendirme yapıldığında ise aydınlık koşulların karanlığa göre daha yüksek naringin miktarı içerdiği tespit edilmiştir. Kültür süreleri içerisinde 2. (0.133 mg/g) ve 3. altkültürün (0.128 mg/g) yüksek değere sahip olduğu gözlemlenmiş ve aralarında fark olmadığı bulunmuştur. MJ2 (0.145 mg/g) ortamının ise diğerlerine göre daha yüksek değerde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.17).

Altıntop kallus kültürlerinde metil jasmonat uygulaması toplam fenolik bileşik miktarına göre değerlendirildiğinde, aydınlık kültür koşullarına göre albedonun (2.226 mg/g) meyve kesiti (1.751 mg/g) eksplantına göre daha iyi sonuca sahip olduğu tespit edilmiştir. Ortam MJ2'nin (2.692 mg/g) diğerlerine göre daha yüksek değere sahip olduğu ve 1. altkültür (2.499 mg/g) ile 3. altkültür (2.373 mg/g) arasında önemli bir fark olmamasına rağmen yüksek fenolik miktarını içerdiği saptanmıştır. Karanlık kültür şartlarında albedonun (1.864 mg/g) meyve kesiti (1.689 mg/g) eksplantından daha yüksek değerde olduğu tespit edilmiştir. MJ2 ortamı (1.984 mg/g) ve 1. altkültürün (2.132 mg/g) daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18. Altıntop kalluslarında metil jasmonat uygulamalarının toplam fenolik bileşik ve naringin miktarı üzerine etkisi

Eksplant	Altkültür	Ortam	Toplam Fenolik Bileşik (mg/g)		Naringin (mg/g)	
			Aydınlık	Karanlık	Aydınlık	Karanlık
Albedo	1	O3	1,392 ij	1,804 ef	0,035 i	0,311 c
		MJ1	2,180 ef	2,147 bc	0,251 e	0,179 ef
		MJ2	4,572 a	1,981 cde	0,702 a	0,421 ab
	2	O3	1,801 gh	3,116 a	0,201 f	0,450 a
		MJ1	1,870 efgh	1,480 ghi	0,198 f	0,108 hi
		MJ2	2,210 e	2,228 b	0,381 c	0,336 c
	3	O3	0,937 kl	0,820 k	0,046 i	0,029 j
		MJ1	3,010 c	1,380 hij	0,311 d	0,193 e
		MJ2	4,210 b	1,820 def	0,422 b	0,254 d
	4	O3	0,556 m	-	0,025 i	-
		MJ1	1,287 jk	-	0,112 gh	-
		MJ2	2,690 cd	-	0,208 f	-
Meyve kesiti	1	O3	3,00 c	2,933 a	0,380 c	0,399 b
		MJ1	1,710 hi	1,870 def	0,131 gh	0,097 i
		MJ2	1,840 fgh	2,060 bcd	0,351 c	0,201 e
	2	O3	0,664 lm	0,530 l	0,010 i	0,156 fg
		MJ1	2,030 efgh	1,540 gh	0,106 gh	0,140 gh
		MJ2	2,570 d	2,140 bc	0,128 gh	0,094 i
	3	O3	2,103 efg	1,210 j	0,310 d	0,156 fg
		MJ1	1,953 efgh	1,240 ij	0,255 e	0,195 e
		MJ2	2,030 efgh	1,680 fg	0,302 d	0,238 d
	4	O3	0,770 lm	-	0,101 h	-
		MJ1	0,930 l	-	0,126 gh	-
		MJ2	1,420 ij	-	0,138 g	-

Aydınlık Toplam Fenolik Bileşik: LSD eksplant: 0.101***, LSD ortam: 0.123***, LSD altkültür: 0.143***, LSD eksplant x altkültür x ortam: 0.350***, Karanlık Toplam Fenolik Bileşik: LSD eksplant: 0.081***, LSD ortam: 0.099***, LSD altkültür: 0.099***, LSD eksplant x altkültür x ortam: 0.244***, Aydınlık Naringin: LSD eksplant: 0.010***, LSD ortam: 0.012***, LSD altkültür: 0.014***, LSD eksplant x altkültür x ortam: 0.036***, Karanlık Naringin: LSD eksplant: 0.011***, LSD ortam: 0.013***, LSD altkültür: 0.013***, LSD eksplant x altkültür x ortam: 0.034***.

Naringin miktarına göre değerlendirme yapıldığında, aydınlık koşullarda albedonun (0.240 mg/g) meyve kesiti (0.194 mg/g) eksplantından daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Ortam MJ2 (0.240 mg/g) ile 1. altkültürün (0.308 mg/g)

diğerlerinden daha yüksek miktarda naringin içerdiği gözlemlenmiştir. Karanlık koşullarda albedo eksplantının meyve kesiti eksplantından daha yüksek değerde olduğu tespit edilmiştir. En yüksek naringin miktarına sahip ortamın MJ2 (0.257 mg/g) ile O3 (0.250 mg/g) olduğu ve bu ortamlar arasında istatistiksel olarak fark olmadığı bulunmuştur. Kültür süresinde ise 1. altkültürün (0.268 mg/g) de en yüksek değerde olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.19. Altıntop kalluslarında metil jasmonat uygulamaları ile kültür koşullarının toplam fenolik bileşik ve naringin miktarı üzerine etkisi

Koşul	Altkültür	Ortam	Toplam Fenolik Bileşik (mg/g)		Naringin (mg/g)	
			Albedo	Meyve kesiti	Albedo	Meyve kesiti
Karanlık	1	O3	1,804 fg	2,933 a	0,311 d	0,399 a
		MJ1	2,147 def	1,870 cd	0,179 f	0,097 hi
		MJ2	1,981 def	2,060 c	0,421 bc	0,201 e
	2	O3	3,116 c	0,530 h	0,450 b	0,156 f
		MJ1	1,480 gh	1,540 ef	0,108 g	0,140 f
		MJ2	2,228 d	2,140 c	0,336 d	0,094 i
	3	O3	0,820 i	1,210 g	0,029 h	0,156 f
		MJ1	1,380 h	1,240 fg	0,193 f	0,195 e
		MJ2	1,820 fg	1,680 de	0,254 e	0,238 d
Aydınlık	1	O3	1,392 h	3,000 a	0,035 h	0,380 ab
		MJ1	2,180 de	1,710 de	0,251 e	0,131 fg
		MJ2	4,572 a	1,840 cde	0,702 a	0,351 b
	2	O3	1,801 fg	0,664 h	0,201 f	0,010 j
		MJ1	1,870 ef	2,030 c	0,198 f	0,106 ghi
		MJ2	2,210 de	2,570 b	0,381 c	0,128 fgh
	3	O3	0,937 i	2,103 c	0,046 h	0,310 c
		MJ1	3,010 c	1,953 cd	0,311 d	0,255 d
		MJ2	4,210 b	2,030 c	0,422 bc	0,302 c

Albedo Toplam Fenolik Bileşik: LSD kültür koşulu: 0.116***, LSD ortam: 0.142***, LSD altkültür: 0.142***, LSD kültür koşulu x altkültür x ortam: 0.348***, Meyve Kesiti Toplam Fenolik Bileşik: LSD kültür koşulu: 0.102***, LSD ortam: 0.126***, LSD altkültür: 0.126***, LSD kültür koşulu x altkültür x ortam: 0.308***, Albedo Naringin: LSD kültür koşulu: 0.014***, LSD ortam: 0.017***, LSD altkültür: 0.017***, LSD kültür koşulu x altkültür x ortam: 0.042***, Meyve Kesiti Naringin: LSD kültür koşulu: 0.010***, LSD ortam: 0.013***, LSD altkültür: 0.013***, LSD kültür koşulu x altkültür x ortam: 0.031***.

Altıntop kallus kültürü çalışmalarında metil jasmonat uygulaması ile kültür şartlarının etkisi toplam fenolik bileşik miktarına göre değerlendirildiğinde, albedo eksplantında aydınlık (2.464 mg/g) koşulların karanlığa (1.864 mg/g) göre daha yüksek sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Kültür süresi 1. altkültür (2.346 mg/g) ile ortam MJ2'nin (2.836 mg/g) iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir. Meyve kesiti eksplantında ise aydınlık (1.989 mg/g) kültür koşullarının karanlıktan (1.689 mg/g) daha yüksek değerde olduğu bulunmuştur. Ortam MJ2 (2.053 mg/g) ve 1. altkültürün (2.235 mg/g) diğerlerine göre daha iyi olduğu belirlenmiştir. Naringin miktarına göre albedo eksplantı incelendiğinde aydınlık (0.282 mg/g) koşulların karanlık (0.253 mg/g) koşullardan daha yüksek değere sahip olduğu tespit edilmiştir. Ortam MJ2 (0.419 mg/g) ve 1. altkültürün (0.316 mg/g) yüksek naringin miktarına sahip olduğu saptanmıştır. Meyve kesiti eksplantına ait sonuçlar incelendiğinde aydınlık (0.219 mg/g) koşulların karanlığa (0.186 mg/g) göre daha yüksek miktarda naringin içerdiği bulunmuştur. Ortam O3 ve 1. altkültürün daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.19).

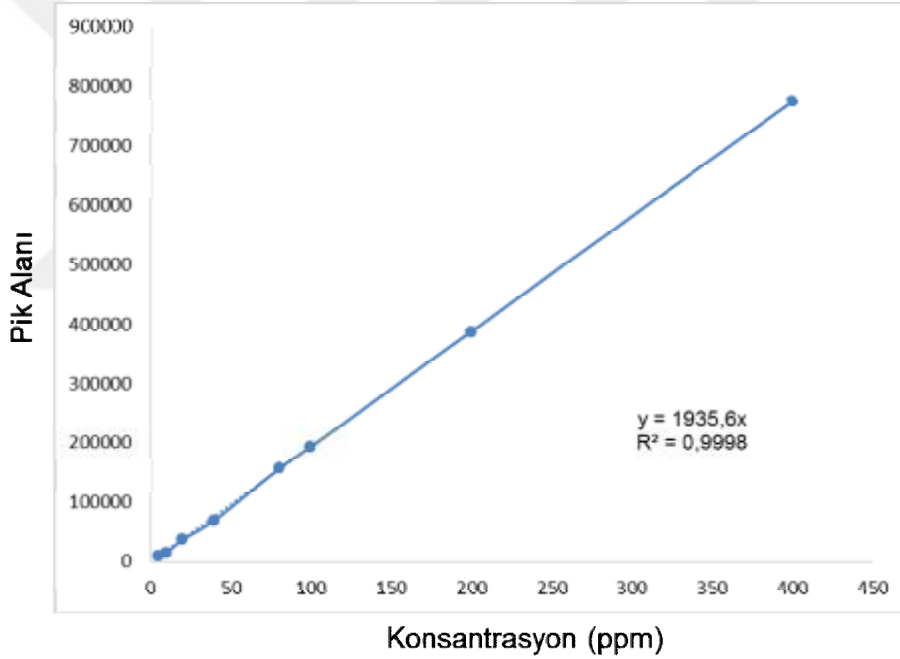
Uçucu bir fitohormon olan ve Jasmonik asitten türevlenen metil jasmonatın kallus kültürü denemelerinde sekonder metabolit üretimini teşvik etmek amacı ile kullanılmaktadır. Ram ve ark. (2013) *Rosa hybrida* L.'nin kallus kültürlerinde MeJA ve salisilik asitin (SA) antosiyanin üretimine etkisini araştırmışlardır. Kullandıkları *Euphorbia millii* ortamına MeJA ve SA'yı ayrı ayrı ya da birlikte ekleyerek denemeler yapmışlardır. MeJA ve SA'nın hem kallus büyümesi hem de antosiyanin üretiminde olumlu etkileri olduğunu bildirmişlerdir. Antosiyanin üretiminde en iyi MeJA konsantrasyonunun 0.5 μ M olduğunu tespit etmişlerdir. Diğer taraftan renklenmenin başlaması ve yoğunlaşması için gerekli gün sayısında bu elisitörlerin herhangi bir etkisinin olmadığını vurgulamışlardır.

Tez çalışmaları kapsamında yürütülen kallus kültüründe MeJA uygulamalarının sekonder metabolit üretiminde olumlu etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Toplam fenolik ve naringin miktarı yönünden değerlendirildiğinde 10 μ M MeJA konsantrasyonuna sahip MJ2 ortamının yüksek sonuç verdiği

gözlemlenmiştir. Diğer çalışmalara benzer olarak her iki bitkisel materyal için albedo eksplantının daha iyi olduğu gözlemlenmiştir. Kültür süreleri dikkate alındığında ise 1. ve 3. altkültürlerin ideal süreler olabileceği tespit edilmiştir.

4.3.2. HPLC Analizlerine Göre Naringin Miktarının Değerlendirilmesi

Naringin miktarının belirlenmesi amacıyla kullanılan HPLC yöntemi seçili ekstraktlar için kullanılmıştır. Duyarlılık, özgünlük ve doğruluğunun daha yüksek olması sebebi ile ayrıca tercih edilmiştir. Standart naringin çözeltileri kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6. HPLC’de naringin kalibrasyon eğrisi

Spektrofotometrik bir yöntem olan Davis testine ait naringin miktarı sonuçları ile HPLC naringin miktarı sonuçları karşılaştırılmıştır. Bu sayede hem Davis testinin doğruluğu hem de elde ettiğimiz naringin miktar sonuçlarının uyumluluğu kıyaslanmıştır. Portakal ve altıntop ekstraktlarına ait naringin

miktarının Davis testi ve HPLC sonuçları mg/g yaş ağırlık cinsinden Çizelge 4.20 ve 4.21’de sunulmuştur.

Çizelge 4.20. Portakal ekstraktlarına ait HPLC ve Davis testleri ile elde edilen naringin miktarı (mg/g yaş ağırlık)

Eksplant	BBD (kin/2,4D)	Altkültür süresi	Kültür Koşulu	Elisitör	Davis	HPLC
Albedo	0.1/1.0	1	Aydınlık	-	0.143	0.138
Albedo	5.0/1.0	1	Karanlık	-	0.237	0.214
Meyve kesiti	5.0/1.0	1	Aydınlık	-	0.128	0.125
Meyve kesiti	5.0/1.0	2	Aydınlık	-	0.117	0.103
Albedo	5.0/1.0	2	Aydınlık	-	0.242	0.237
Meyve kesiti	5.0/1.0	2	Aydınlık	-	0.117	0.103
Albedo	5.0/1.0	3	Aydınlık	-	0.146	0,076
Albedo	5.0/1.0	4	Aydınlık	-	0.058	0,028
Meyve kesiti	5.0/1.0	4	Aydınlık	-	0.079	0.032
Meyve kesiti	0.1/2.0	1	Aydınlık	-	0.108	0.093
Albedo	0.1/2.0	2	Karanlık	-	0.090	0.071
Meyve kesiti	0.1/2.0	3	Aydınlık	-	0.111	0.046
Meyve kesiti	0.1/2.0	4	Aydınlık	-	0.041	0.019
Albedo	1.0/1.0	1	Aydınlık	7.5 µM	0.198	0.185
Albedo	1.0/1.0	2	Aydınlık	7.5 µM	0.221	0.187
Albedo	1.0/1.0	3	Aydınlık	7.5 µM	0.142	0.115
Meyve kesiti	1.0/1.0	3	Aydınlık	7.5 µM	0.171	0.111
Albedo	1.0/1.0	1	Karanlık	7.5 µM	0.087	0.065
Meyve kesiti	1.0/1.0	1	Karanlık	7.5 µM	0.093	0.065
Albedo	1.0/1.0	1	Karanlık	20g/L	0.122	0.092
Albedo	1.0/1.0	2	Karanlık	20g/L	0.261	0.257
Albedo	1.0/1.0	3	Aydınlık	20g/L	0.177	0.145
Meyve kesiti	1.0/1.0	1	Aydınlık	40g/L	0.162	0.135
Albedo	1.0/1.0	1	Karanlık	40g/L	0.186	0.166
Albedo	1.0/1.0	2	Karanlık	40g/L	0.229	0.260

Çizelge 4.21. Altıntop ekstraktlarına ait HPLC ve Davis testleri ile elde edilen naringin miktarı (mg/g yaş ağırlık)

Eksplant	BBD (kin/2,4D)	Altkültür süresi	Kültür Koşulu	Elisitör	Davis	HPLC
Albedo	0.1/1.0	1	Aydınlık	-	0,276	0,198
Meyve kesiti	0.1/1.0	1	Aydınlık	-	0,204	0,100
Meyve kesiti	0.1/2.0	1	Aydınlık	-	0,349	0,291
Meyve kesiti	0.1/2.0	1	Karanlık	-	0,558	0,363
Albedo	0.1/1.0	1	Karanlık	-	0,534	0,223
Albedo	0.1/1.0	2	Karanlık	-	0,350	0,303
Albedo	0.1/2.0	1	Karanlık	-	0,484	0,329
Albedo	1.0/1.0	1	Aydınlık	-	0,095	0,070
Albedo	1.0/1.0	1	Karanlık	-	0,311	0,140
Albedo	1.0/1.0	2	Karanlık	-	0,450	0,318
Albedo	5.0/1.0	1	Karanlık	-	0,384	0,165
Albedo	1.0/1.0	5	Aydınlık	-	0,051	0,044
Meyve kesiti	1.0/1.0	1	Aydınlık	-	0,360	0,148
Albedo	1.0/1.0	1	Karanlık	7.5 µM	0,879	0,585
Albedo	1.0/1.0	2	Karanlık	10.0 µM	0,336	0,312
Meyve kesiti	1.0/1.0	1	Aydınlık	20g/L	0,257	0,198
Albedo	1.0/1.0	1	Aydınlık	20g/L	0,243	0,169
Albedo	1.0/1.0	1	Karanlık	20g/L	0,128	0,071
Albedo	1.0/1.0	2	Karanlık	20g/L	0,048	0,019
Albedo	1.0/1.0	1	Aydınlık	40g/L	0,133	0,082
Albedo	1.0/1.0	1	Karanlık	40g/L	0,657	0,278
Albedo	1.0/1.0	2	Aydınlık	40g/L	0,102	0,041
Albedo	1.0/1.0	2	Karanlık	40g/L	0,129	0,067

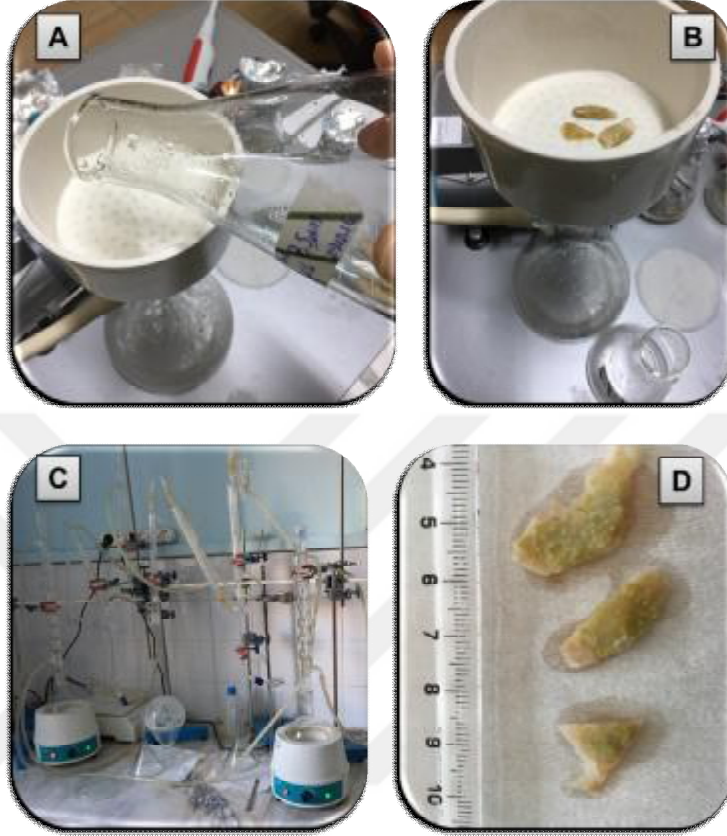
Analizler sonucu elde edilen naringin miktarları karşılaştırıldığında HPLC ile Davis testi arasında önemli bir farkın olmadığı gözlemlenmiştir. Az sayıda örneğe ait Davis testi sonuçlarının HPLC sonuçlarına göre daha yüksek miktarda olduğu tespit edilmiştir. Fisher ve Wheaton (1976) yaptıkları çalışmada altıntop meyve sularında naringin ve naringenin rutinosisid analizi için HPLC ve Davis testlerini kullanmışlardır. Davis testi ile elde edilen naringin miktarının HPLC

sonuçlarına göre sürekli yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Davis testi sonuçlarının 2 kat daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Tez çalışması her ne kadar bu araştırma ile benzerlik gösterse de naringin sonuçları Davis testinde sürekli yüksek değerde olmamıştır. Elde edilen birçok sonucun HPLC sonuçları ile oldukça yakın olduğu tespit edilmiştir.

Davis testine göre naringin sonuçlarının HPLC sonuçlarına göre yaklaşık 2.1 kat daha yüksek gösterdiğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Mizelle ve ark., 1965; Tatum ve Berry, 1973). Farklı olarak Shaw ve ark. (1991) yaptıkları çalışmada altıntop albedo dokusunda giberellik asit ile meyve olgunlaşmasının limonin ve naringin miktarına etkisini araştırmışlardır. HPLC sonuçlarına göre Davis testi sonuçlarının sadece 1.2 kat fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Tez çalışmasında ise altıntop ekstraktlarına ait naringin değerlerinin 1.07 - 2.52 kat fazla olduğu belirlenmiştir.

4.3.3. Süspansiyon Hücre Kültürlerinde Toplam Fenolik Bileşik ve Naringin Miktarı

Kallus kültürü çalışmalarında elde edilen bulgulara göre süspansiyon hücre kültürleri için eksplant kaynağı albedo ve kültür koşulu olarak da aydınlık koşullar kullanılmıştır. Süspansiyon hücre kültürü çalışmalarında uzun kültür sürelerinin kallus gelişimini negatif etkilemesi sebebi ile kültür süresi 20 güne kadar devam ettirilmiştir. Bu sürelerde kallus oluşumları gözlemlenmiş ve sekonder metabolit ekstraksiyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Süspansiyon hücre kültürlerinde gelişen kalluslardan ortamların uzaklaştırılması ve ekstraksiyonu. A-B. Kültür ortamlarının filtre edilerek uzaklaştırılması, C-D. Gelişen kallusların kurutulması ve ekstraksiyonu.

Metil jasmonat ve sakkaroz uygulamaları ile hazırlanan süspansiyon hücre kültürlerinde gelişen kallusların toplam fenolik bileşik ve naringin miktarlarına ait sonuçlar Çizelge 4.22 ve 4.23'te sunulmuştur.

Çizelge 4.22. Albedo kalluslarına ait süspansiyon hücre kültürlerinde sakkaroz uygulamalarının toplam fenolik bileşik ve naringin miktarı üzerine etkisi

Ortam	Örnek Alma zamanı (gün)	Portakal		Altıntop	
		Fenolik	Naringin	Fenolik	Naringin
O3	5	1,743 e	0,113 bc	2,247 e	0,507 d
O3	10	0,433 h	0,061 cde	0,513 g	0,255 g
O3	15	2,095 d	0,007 e	2,893 d	0,632 b
O3	20	2,536 c	0,273 a	3,360 bc	0,190 h
S1	5	1,680 ef	0,064 cde	1,337 f	0,365 e
S1	10	2,029 d	0,140 b	3,386 bc	0,179 h
S1	15	1,630 ef	0,038 de	3,580 b	0,732 a
S1	20	3,368 b	0,262 a	3,644 b	0,353 ef
S2	5	0,771 g	0,265 a	2,484 e	0,364 e
S2	10	0,795 g	0,111 bcd	4,400 a	0,669 b
S2	15	3,634 a	0,019 e	3,081 cd	0,321 f
S2	20	1,551 f	0,297 a	3,141 cd	0,567 c

Portakal, Toplam Fenolik Bileşik: LSD ortam: 0.070***, LSD örnek alma zamanı: 0.081***, LSD örnek alma zamanı x ortam: 0.140***, Naringin miktarı: LSD ortam: 0.036***, LSD örnek alma zamanı: 0.042***, LSD örnek alma zamanı x ortam: 0.073***. Altıntop, Toplam Fenolik Bileşik: LSD ortam: 0.202***, LSD örnek alma zamanı: 0.234***, LSD örnek alma zamanı x ortam: 0.405***, Naringin miktarı: LSD ortam: 0.018***, LSD örnek alma zamanı: 0.021***, LSD örnek alma zamanı x ortam: 0.036***.

Süspansiyon hücre kültürü çalışmalarında portakal albedo dokularından gelişen kallusların S1 ortamında en yüksek toplam fenolik bileşik miktarına (2.17 mg/g) sahip olduğu tespit edilmiştir. Toplam fenolik bileşik miktarı yönünden 20. gün (2.48 mg/g) ve 15. gün (2.45 mg/g) kültür süreleri arasında istatistiksel olarak farkı olmadığı ve en yüksek değere sahip oldukları tespit edilmiştir. Benzer olarak altıntop albedo kalluslarının 20.gün (3.38 mg/g) ve 15. gün (3.18 mg/g) kültür sürelerinin en yüksek toplam fenolik bileşik miktarına sahip olduğu ve istatistiksel olarak aralarında fark olmadığı gözlemlenmiştir. Ortam S2 (3.27 mg/g)'nin diğer ortamlara göre daha yüksek fenolik bileşik miktarına sahip olduğu bulunmuştur. Süspansiyon hücre kültürlerinde elisitör olarak sakkaroz uygulamasının sekonder

metabolit üretiminde farklı etkileri olduğu tespit edilmiştir. Benzer bir araştırmada Baque ve ark. (2012a) *Morinda sitrifolia* (L.)'nın adventif kök süspansiyon kültürlerinde sekonder metabolit üretimi üzerinde farklı sükroz konsantrasyonlarının etkisini araştırmışlardır. Antrakınon (251.89 g/L DW), fenolik (165.14 g/L DW) ve flavonoidler (163.56 g/L DW)'in maksimum üretimini %1 sükroz içeren kültürden elde etmişlerdir. Ek olarak %5 sükroz içeren ortamlarda kök üretiminin daha iyi olduğunu tespit etmişlerdir.

Çizelge 4.23. Albedo kalluslarına ait süspansiyon hücre kültürlerinde MeJA uygulamalarının toplam fenolik bileşik ve naringin miktarı üzerine etkisi

Ortam	Örnek Alma zamanı (gün)	Portakal		Altıntop	
		Fenolik	Naringin	Fenolik	Naringin
O3	5	1,742 f	0,113 de	2,247 d	0,507 d
O3	10	0,456 i	0,061 de	0,513 f	0,255 f
O3	15	2,132 d	0,007 e	2,903 c	0,632 a
O3	20	2,535 c	0,273 b	3,360 b	0,190 g
MJ1	5	1,673 f	0,097 de	2,897 c	0,540 cd
MJ1	10	1,681 f	0,293 b	3,500 b	0,520 d
MJ1	15	3,095 a	0,182 bcd	2,668 c	0,402 e
MJ1	20	1,894 e	0,271 b	2,762 c	0,290 f
MJ2	5	1,340 g	0,118 cde	1,014 e	0,633 a
MJ2	10	2,891 b	0,238 bc	0,809 ef	0,585 b
MJ2	15	3,081 a	0,250 b	5,276 a	0,576 bc
MJ2	20	1,061 h	0,605 a	2,599 cd	0,581 bc

Portakal, Toplam Fenolik Bileşik: LSD ortam: 0.058***, LSD örnek alma zamanı: 0.067***, LSD örnek alma zamanı x ortam: 0.117***, Naringin miktarı: LSD ortam: 0.061***, LSD örnek alma zamanı: 0.070***, LSD örnek alma zamanı x ortam: 0.122***. Altıntop, Toplam Fenolik Bileşik: LSD ortam: 0.182***, LSD örnek alma zamanı: 0.210***, LSD örnek alma zamanı x ortam: 0.364***, Naringin miktarı: LSD ortam: 0.022***, LSD örnek alma zamanı: 0.025***, LSD örnek alma zamanı x ortam: 0.044***.

MeJA uygulaması, portakal albedo kalluslarının sekonder metabolit üretimi üzerinde farklı etkiler göstermiştir. Özellikle farklı konsantrasyonlarda MeJA içeren MJ1 ve MJ2 ortamları fenolik bileşik miktarında artışa sebep olmuştur. Toplam fenolik bileşik miktarına göre MJ2 (2.09 mg/g) ve MJ1'in (2.08 mg/g) en yüksek değere sahip olduğu ve aralarında istatistiksel farkın olmadığı tespit edilmiştir. MeJA miktarı ile fenolik miktarı arasında doğru orantı olduğu gözlemlenmiştir. Optimum kültür süresinin 15. gün olduğu (2.77 mg/g) belirlenmiştir. Altıntop albedo kalluslarından elde edilen verilere göre MJ2 (2.95 mg/g) ortamının en yüksek fenolik bileşik değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Diğer ortamlar arasında ise istatistiksel bir farkın olmadığı bulunmuştur. Portakalda olduğu gibi altıntopta da 15 günlük kültür süresinin (3.61 mg/g) fenolik bileşik üretiminde daha iyi olduğu gözlemlenmiştir. Benzer olarak Wang ve ark. (2015) *Hypericum perforatum*'un hücre süspansiyon kültürlerinde flavonoid üretimi üzerinde MeJA'nın etkisinin araştırmışlardır. En yüksek flavonoid üretimi (280 mg/L) 15 günlük kültür süresinde ve MeJA'nın 100 µmol/L olduğu konsantrasyonda tespit etmişlerdir.

Portakal albedo süspansiyon hücre kültürlerinde naringin miktarı için S2 ortamının (0.17 mg/g) en yüksek değere sahip olduğu bulunmuştur. Diğer ortamlar arasında ise istatistiksel olarak fark gözlemlenmemiştir. Kültür süresi ile naringin miktarı arasında doğru bir orantı olmasa da 20. günün (0.27 mg/g) en yüksek değere sahip olduğu tespit edilmiştir. Benzer olarak altıntopta da Ş2 ortamının (0.48 mg/g) en yüksek değere sahip olduğu bulunmuştur. Farklı olarak ise 15 günlük (0.56 mg/g) kültür süresinin en yüksek miktara sahip olduğu bulunmuştur. Wee ve ark. (2013) yaptıkları çalışmalarda *Sauropus androgynus*'un kallus kültürlerinde elisitörlerin etkisini incelemişlerdir. Elisitör olarak salisilik asit uygulanmış somatik embriyoların naringin (92.8 kat artış, 11471.76 µg/g FW), TBHQ (16.3 kat artış, 11625.10 µg/g FW) ve kaempferol (10.7 kat artış, 2225.92 µg) miktarında anlamlı olarak daha yüksek üretim gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar *in vitro* sekonder metabolit ve antioksidan üretiminde elisitör

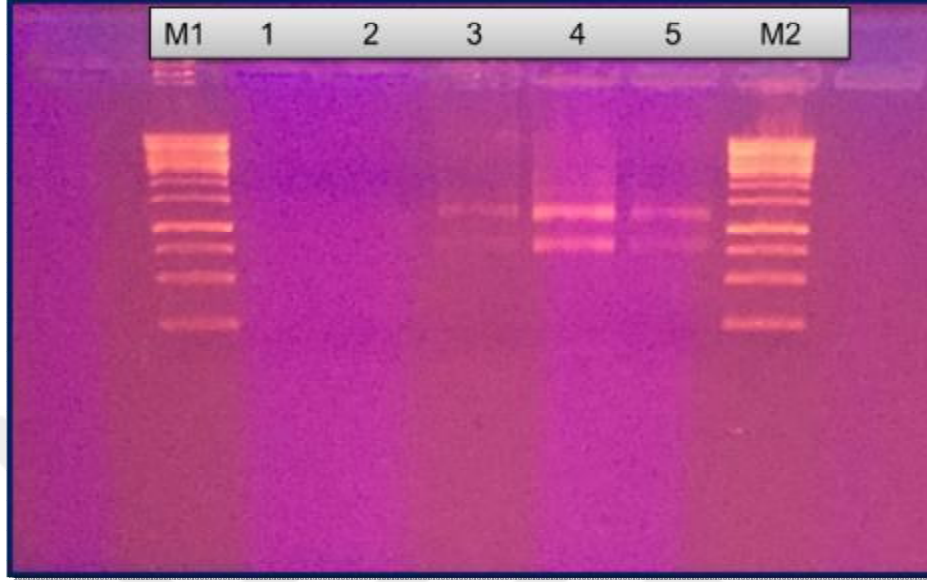
uygulamasının hem önemli hem de gerekli olduğunu vurgulamışlardır. Tez çalışmaları kapsamında elisitör olarak sakkaroz uygulaması ile kültür süresinin naringin üretimi üzerinde farklı etkilere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Farklı bir elisitör çalışmasında Baque ve ark. (2012b) *Morinda citrifolia* (L.)'nın adventif kök süspansiyon kültürlerinde antrakinon (AQ), fenolik ve flavonoid üretimine elisitör (kitosan ve pektin) uygulamasının etkisini araştırmışlardır. Kitosanın 0.2 mg/ml'lik konsantrasyonu AQ, fenolik ve flavonoid üretiminde başarılı bulunmuştur. Ayrıca kitosan uygulamasının AQ miktarında %45'lik bir artışa sebep olduğunu bulmuşlardır.

Süspansiyon hücre kültürlerinde MeJA uygulamasının naringin üretimi üzerine etkisi incelendiğinde portakal albedo kalluslarında MJ2 (0.30 mg/g) ortamının en yüksek değere sahip olduğu tespit edilmiştir. En yüksek kültür süresinin 20. gün (0.38 mg/g) olduğu bulunmuştur. Altıntopta ise 5 (0.56 mg/g) ve 15 günlük (0.53mg/g) kültür süreleri en yüksek değerdeyken aralarında istatistiksel bir fark belirlenmemiştir. Portakal da olduğu gibi altıntopta da MJ2 ortamının (0.59 mg/g) en yüksek değere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ek olarak MeJA konsantrasyonu ile naringin miktarı arasında doğru orantı tespit edilmiştir.

4.4. Moleküler Analizler

4.4.1. RNA İzolasyonu

Altıntop ve portakal meyvelerine ait albedo dokuları ile altıntop albedo dokusundan gelişen kalluslardan RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. İzole edilen RNA'ların kalite ve miktarları NanoDrop spektrofotometre, Agilent Bioanalyzer 2100 ve agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir. Agaroz jelde, ribozomal RNA'ların 18S ve 28S alt birimleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.8).

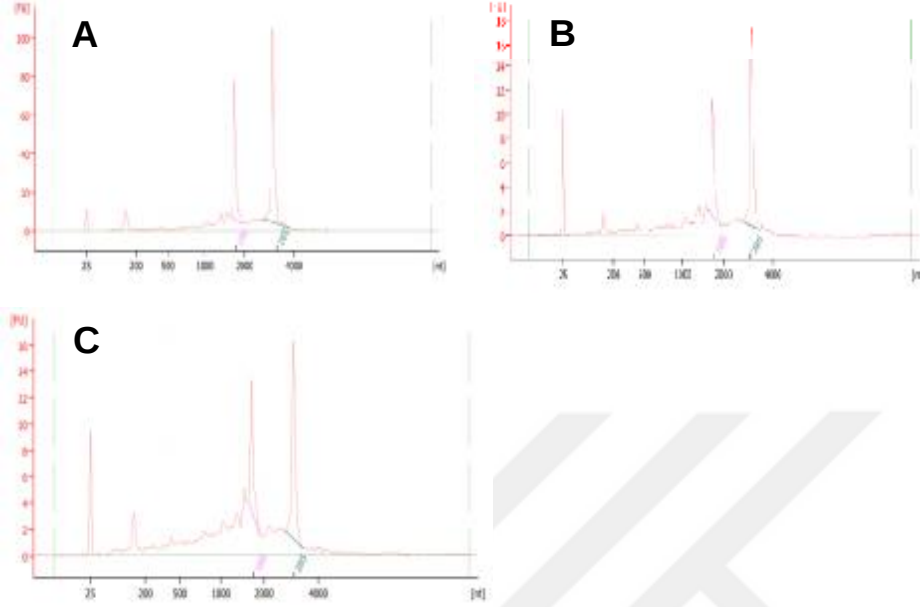


Şekil 4.8. İzole edilen RNA'ların agaroz jeldeki görüntüsü. M1-M2: 1kb DNA Marker, 1: Negatif kontrol, 2: Altıntop albedo, 3: Altıntop albedo, 4: Portakal kabuk, 5: Portakal albedo

Çizelge 4.24. Ekstrakte edilen RNA örneklerinin Nanodrop ile yapılan ölçümlerine ait sonuçlar

Örnekler	ng/μL	A260	260/230	260/280
Portakal Albedo	123.42	3.085	1.15	1.92
Altıntop Albedo	36.85	0.921	0.21	1.76
Altıntop Albedo Kallus	40.09	1.002	-1.07	2.61

Çizelge 4.24'deki RNA örneklerinin spektrofotometrik sonuçlarına göre elde edilen RNA miktarlarının 36.85 ng/μL, 40.09 ng/μL ve 123.42 ng/μL olduğu gözlemlenmiştir. Agilent Bioanalyzer 2100 ile gerçekleştirilen RNA analizlerine ait Şekil 4.9'da sunulmuştur. Elde edilen piklerde RNA'nın alt birimleri (28S ve 18S) ayrı ayrı gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Agilent Bioanalyzer 2100 ile yürütülen RNA analizlerine ait sonuçlar. A. Portakal albedo, B. Altıntop albedo, C. Kallus (Altıntop albedo)

4.4.2. RNA Sekans Analizleri

Altıntop albedo, portakal albedo ve altıntop albedo dokusundan gelişen kallus örneklerine ait RNA'ların sekans analizleri Illumina HiSeq™ 2000 cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sekans analizleri sonucunda örneklerle ait ham veriler elde edilmiştir (Çizelge 4.25). Bu verilere göre toplam 47.51 ile 49.78 Mb (Mega base) arasında ham okuma elde edilmiştir. Toplam temiz okumaların ise 44.89-46.02 Mb arasında olduğu belirlenmiş ve temiz okuma oranının da %92.45 ile %95.61 arasında olduğu tespit edilmiştir. Toplam temiz baz miktarının ise 4.49-4.60 Gb (Giga base) aralığında olduğu bulunmuştur.

Çalışmalarda kullanılan Illumina teknolojisi kullanarak yürütülen farklı bir çalışmada Fukushima ve ark. (2015) *Perilla frutescens* var. *crispa*'nın yeşil ve kırmızı formlarında transkriptom analizleri gerçekleştirmişlerdir. RNA-seq analizleri ile 1.2 milyar kısa okuma elde etmişlerdir. *De novo* analizleri sonucunda kırmızı formlarda 47.788 gen ve yeşil formlarda ise 47.840 gen tespit etmişlerdir.

Turunçgillerle ilgili yapılan bir çalışmada ise Sun ve ark. (2014) dijital gen ekspresyon profillemesi ile kan portakalının (*C. cinensis*) transkriptom analizlerini yapmışlardır. Toplam 21 milyondan fazla temiz okuma elde etmişlerdir. Temiz okumaların yaklaşık %25.2-39.9'unun turunçgil genomu ile benzerlik göstermediğini tespit etmişlerdir. Portakal ve altıntop meyvelerini kullanarak yürütülen tez çalışmaları kapsamında toplam temiz okuma oranının %92.45 ile %95.61 arasında olduğu belirlenmiştir. Çalışmalarda *C. clementina* referans genom olarak kullanılmıştır.

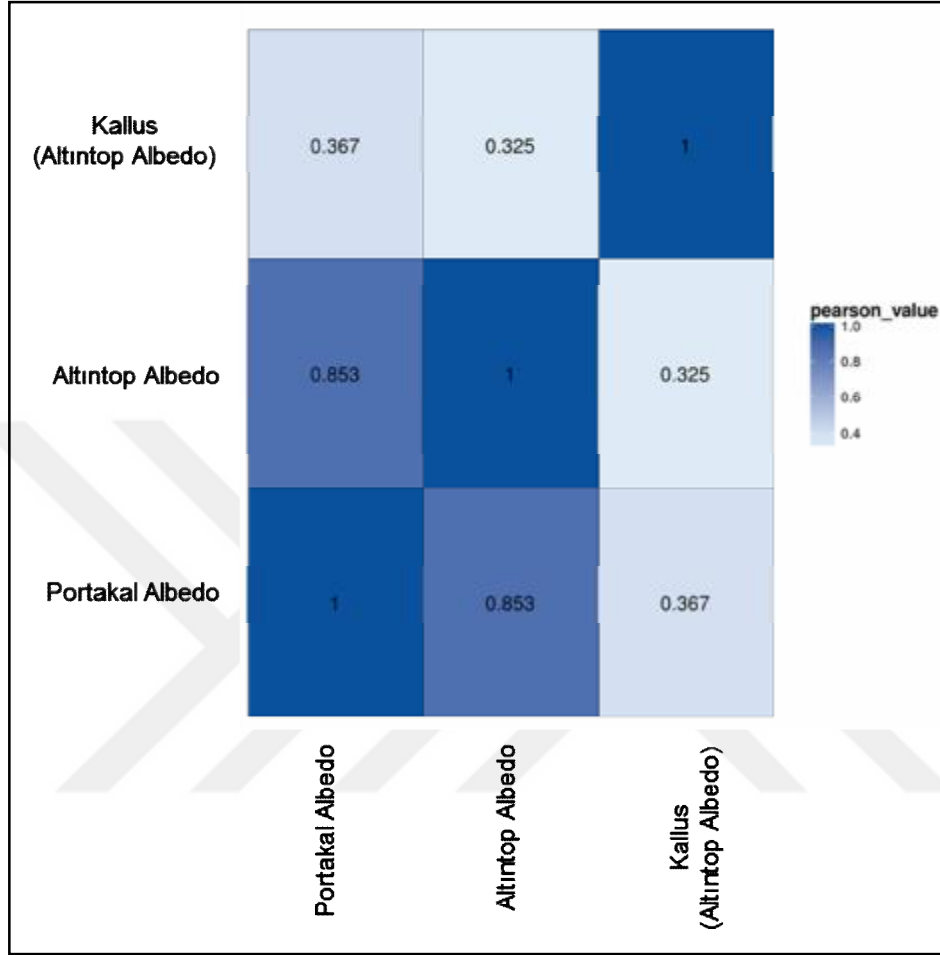
Çizelge 4.25. RNA-seq analizleri ile elde edilen okumalara ait veriler

Örnek	Toplam Ham Okuma (Mb)	Toplam Temiz Okuma (Mb)	Toplam Temiz Baz (Gb)	Temiz Okuma Oranı (%)
Portakal Albedo	47.51	44.89	4.49	94.48
Altıntop Albedo	47.51	45.43	4.54	95.61
Kallus (Altıntop Albedo)	49.78	46.02	4.60	92.45

Genom haritalamasında okuma filtrelemelerinden sonra temiz okumalar referans genoma göre haritalanmıştır. Toplam haritalama oranının %87.70-91.68 arasında değiştiği gözlemlenmiştir.

4.4.2.1. Gen Ekspresyon Analizleri

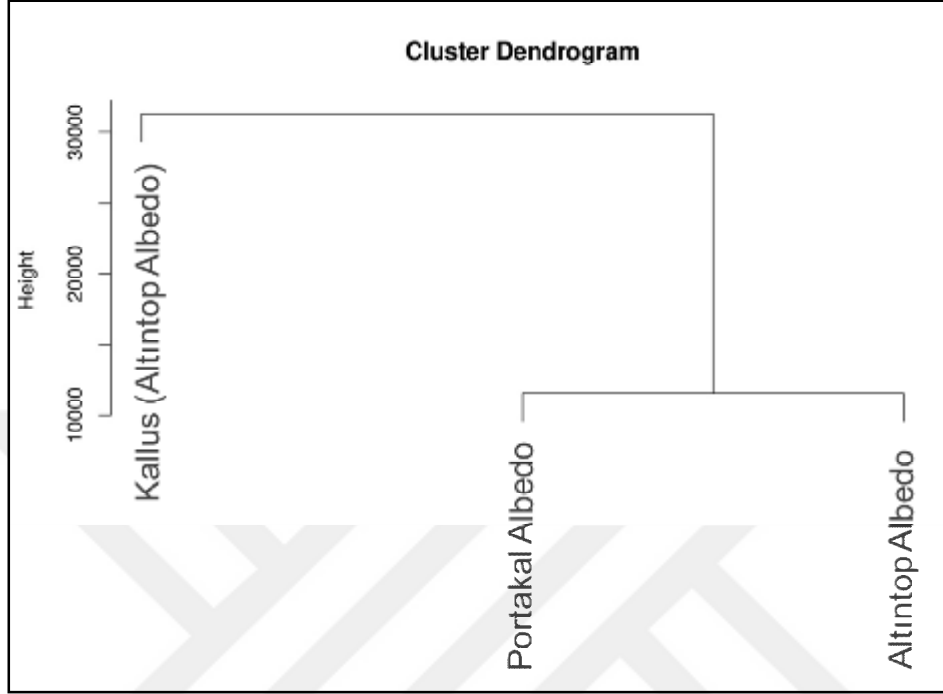
Yeni transkriptlerin belirlenmesinden sonra, yeni transkriptler referans transkripte göre hizalanmıştır. Daha sonra hızlı ve etkili bir okuma düzenleyicisi olan Bowtie2 kullanılarak temiz okumalar eşleştirilmiştir. Daha sonra hem gen hem de transkript ifade seviyesini hesaplayabilen bir araç (RSEM) kullanılarak gen ekspresyon seviyeleri hesaplanmıştır. FPKM değerleri hesaplanarak gen ifade seviyeleri belirlenmiş ve örneklere ait FPKM değerleri EK 2'de verilmiştir.



Şekil 4.10. Gen ifadesinin örnekler arasındaki korelasyonu

Çizelge 4.26. Örnekler arasındaki gen ifadesi korelasyonuna ait değerler

Örnek	Portakal Albedo	Altıntop Albedo	Kallus (Altıntop Albedo)
Portakal Albedo	1.00	0.85	0.37
Altıntop Albedo	0.85	1.00	0.32
Kallus (Altıntop Albedo)	0.37	0.32	1.00

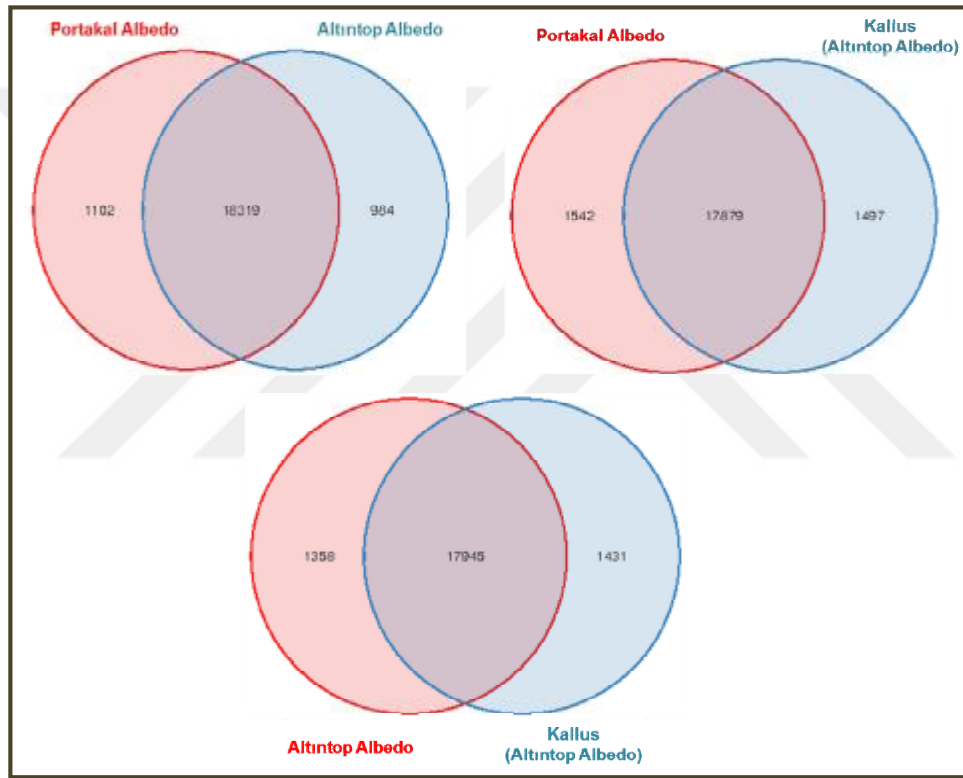


Şekil 4.11. Örneklerin gen ifadeleri açısından kümelenmesini gösteren dendrogram

Örnekler arasındaki korelasyon değerleri ile korelasyon grafiği Çizelge 4.26 ve Şekil 4.10’da verilmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde altıntop albedo ile kallus (altıntop albedo) arasındaki ilişkinin (0.325) oldukça düşük olduğu gözlemlenmiştir. Toplam 0.853 korelasyon değeri ile de altıntop ve portakal albedo örneklerinin yüksek ilişkide olduğu gözlemlenmiştir. Ek olarak bu FPKM değerleri kullanılarak örnekler arasında hiyerarşik kümelemeyi gösteren dendrogram oluşturulmuştur (Şekil 4.11). Portakal ve altıntop albedo örnekleri arasında yakın ilişki varken kallus örneğinin diğerlerinden farklı kümelendiği tespit edilmiştir.

Örnekler arasında ortak veya farklı eksprese edilen genler, venn diyagramı kullanılarak görüntülenmiştir (Şekil 4.12). Portakal albedo ve altıntop albedo örnekleri arasında toplam 18319 genin ortak ifade olduğu tespit edilmiştir. Portakal albedoda ifade olan 1102 genin altıntop albedoda ifade olmadığı gözlemlenmiş ve

altıntop albedoda ifade olurken portakal albedoda ifade olmayan 984 genin var olduğu tespit edilmiştir. Altıntop albedo ile kallus örneğinde toplam 17945 genin ortak ifade edildiği belirlenmiştir. Kallusta ifade olan 1431 genin albedoda ifade olmadığı, 1358 genin ise altıntopta ifade olurken kallusta ifade olmadığı bulunmuştur. Portakal albedo ve kallus arasında 17879 genin ortak ifade edildiği gözlemlenmiştir.



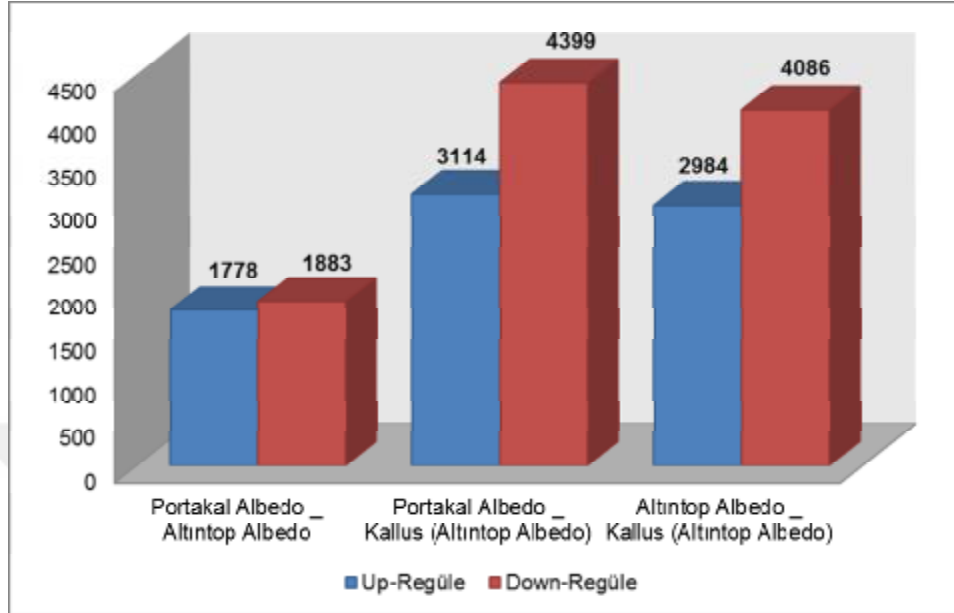
Şekil 4.12. Örnekler arasında ifade edilen genlerin analizi

Liu ve ark. (2012) ‘Suli’ armut (*Pyrus pyrifolia*) çeşidinin dormansi fazında aktif olan genleri RNA-seq analizi ile belirlemişlerdir. Illumina RNA-seq sistemini kullanarak *de novo* transkriptom analizi ve dijital gen ekspresyonu (DGE) profillemesi analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Toplam 69393 gen (ortalama 853 bp uzunluk) belirlemişlerdir. Hiyerarşik kümeleme analizini kullanarak farklı

seviyelerde ifade edilen 190 geni yedi grup içerisine yerleştirmişlerdir. Zenoni ve ark. (2010) üzümde (*Vitis vinifera*) meyve gelişimi sırasında aktif olan genlerin ifadesini araştırmışlardır. Illumina genome analyzer II kullanarak yürüttükleri RNA-seq analiz sonuçlarına göre 59 milyondan fazla sekans elde etmişlerdir. Meyve gelişimi sırasında toplam 17324 genin aktif olduğunu gözlemlemişlerdir. Illumina teknolojisini kullanarak yürütülen RNA-seq çalışmalarında hem meyve dokularında hem de kallusta aktif olan genler tespit edilmiştir. Her iki meyve ve kallus örneği arasında ifade edilen ortak ya da ortak olmayan çok sayıda gen tespit edilmiştir.

4.4.2.2. Farklı Seviyelerde İfade Olan Genlerin (DEGs) Belirlenmesi

Yapılan analizler sonucu elde edilen veriler kullanılarak örnekler arasında farklı seviyelerde ifade olan genler tespit edilmiştir. DEG'lerin belirlenmesinde PossionDis algoritması kullanılmıştır. Analizler sonucu up regüle ve down regüle olan genler belirlenmiştir (Şekil 4.13). Portakal albedo ve altıntop albedo arasında toplam 3661 gen tespit edilmiş ve bunların 1778'inin up-regüle, 1883'ünün de down-regüle olduğu belirlenmiştir. Portakal albedo ile kallus arasında ise 7513 gen tespit edilirken bunların 3114'ünün up-regüle 4399'unun down-regüle olduğu gözlemlenmiştir. Altıntop albedo ve aynı dokudan gelişmiş olan kallus arasında toplam 7070 gen tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre meyveler arasındaki analizlerden ziyade kallus ile yapılan çalışmalarda daha fazla gen tespit edilmiştir.

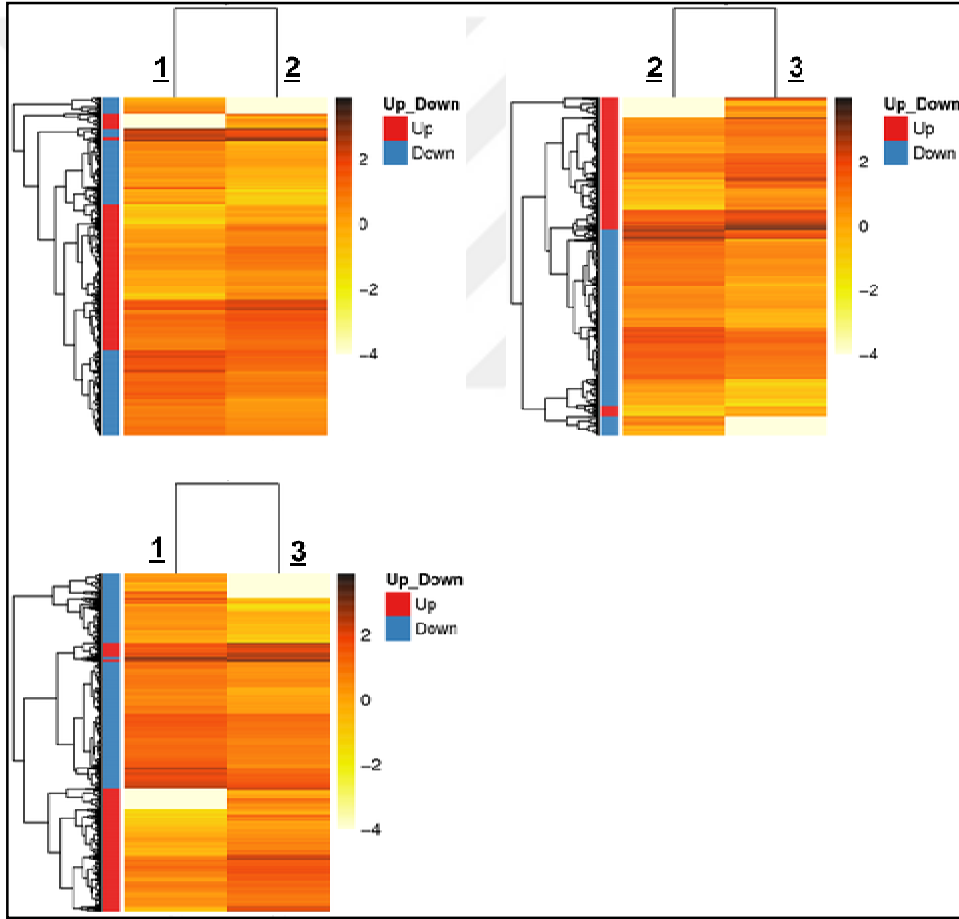


Şekil 4.13. Farklı ifade olan genlerin örnekler arasındaki durumu

Ji ve ark. (2015) elma (*Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana*) kallusunda antosiyanin biyosentezini baskılayan oksin ile ilişkili transkriptomları araştırmışlardır. Farklı konsantrasyonlarda 2,4D ve NAA ile desteklenmiş MS ortamlarında geliştirilen kallusları kullanarak Illumina HiSeq™ 2000 sistemi ile RNA-seq analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları uygulamalarda 2,4D uygulamasında 3070 ve NAA uygulamasında ise 2533 farklı seviyelerde ifade edilen gen tespit etmişlerdir. Toplam her uygulamadan elde edilen sonuçlarda 937 genin up-regüle ve 902 genin de down-regüle olduğunu belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada ise Lin ve ark. (2015) yapmış oldukları araştırmada Ponkan mandarin (*Citrus reticulata*) meyvesinde şeker ve organik asit metabolizmasının transkriptom ve metabolom analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Farklı ifade olan genler arasındaki ilişkiyi Venn diagramı kullanarak belirlemişler ve meyve olgunlaşması sırasında 85 up-regüle ve 59 down regüle geni tespit etmişlerdir. Sakkaroz fosfat sentaz geninin up-regüle olduğunu gözlemlemişlerdir. Yürütülen

tez çalışmasında ise kallus ile meyvelerin albedo dokuları birlikte değerlendirilmiş ve 2984-3114 up-regüle, 4086-4399 down-regüle gen gözlemlenmiştir.

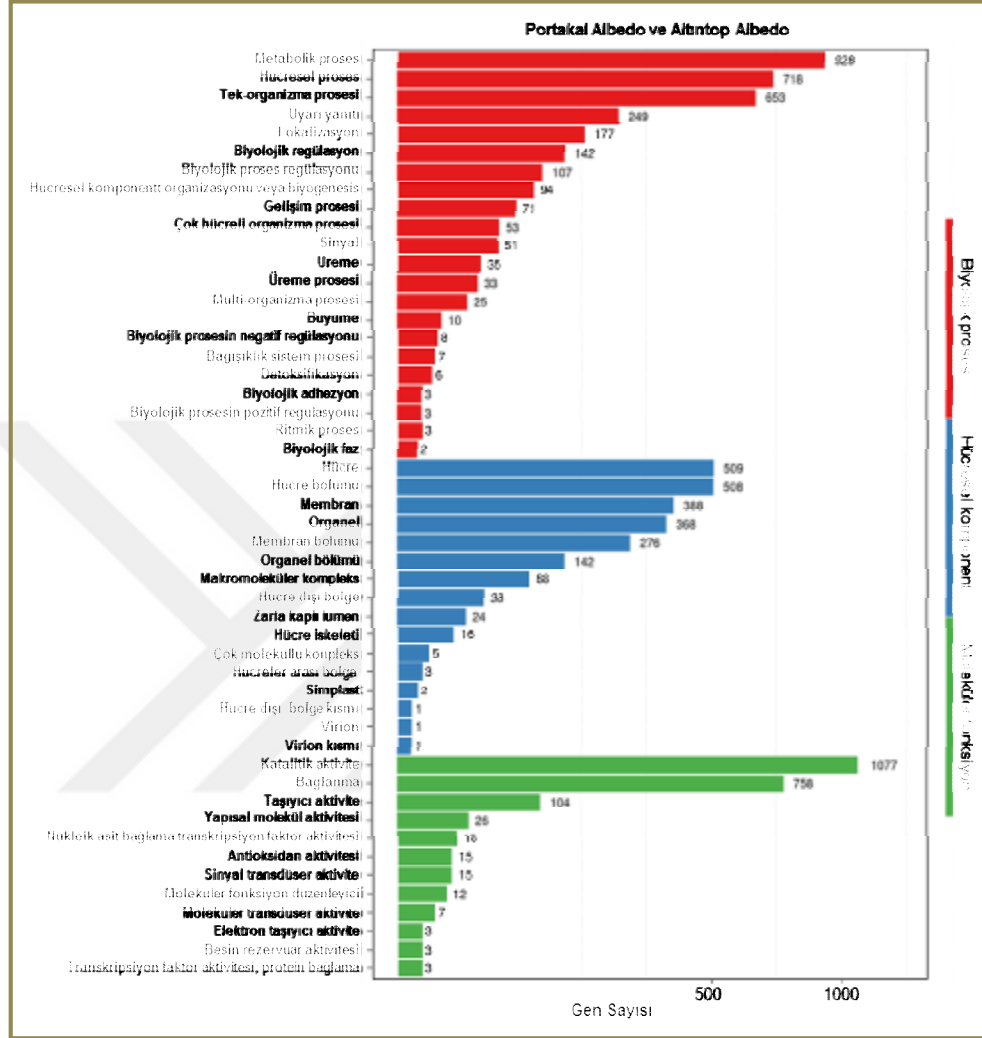
Örnekler ve genler arasındaki benzerliklere dayalı istatistiksel kümeleme analizleri ile oluşturulan HeatMap görüntüleri, çalışmalarda elde edilmiştir. Oluşturulan HeatMap görüntüleri Şekil 4.14'te sunulmuştur. HeatMap görüntülerinde koyu rengin yüksek ifade seviyesini açık renk ise düşük ifade seviyesini temsil etmektedir.



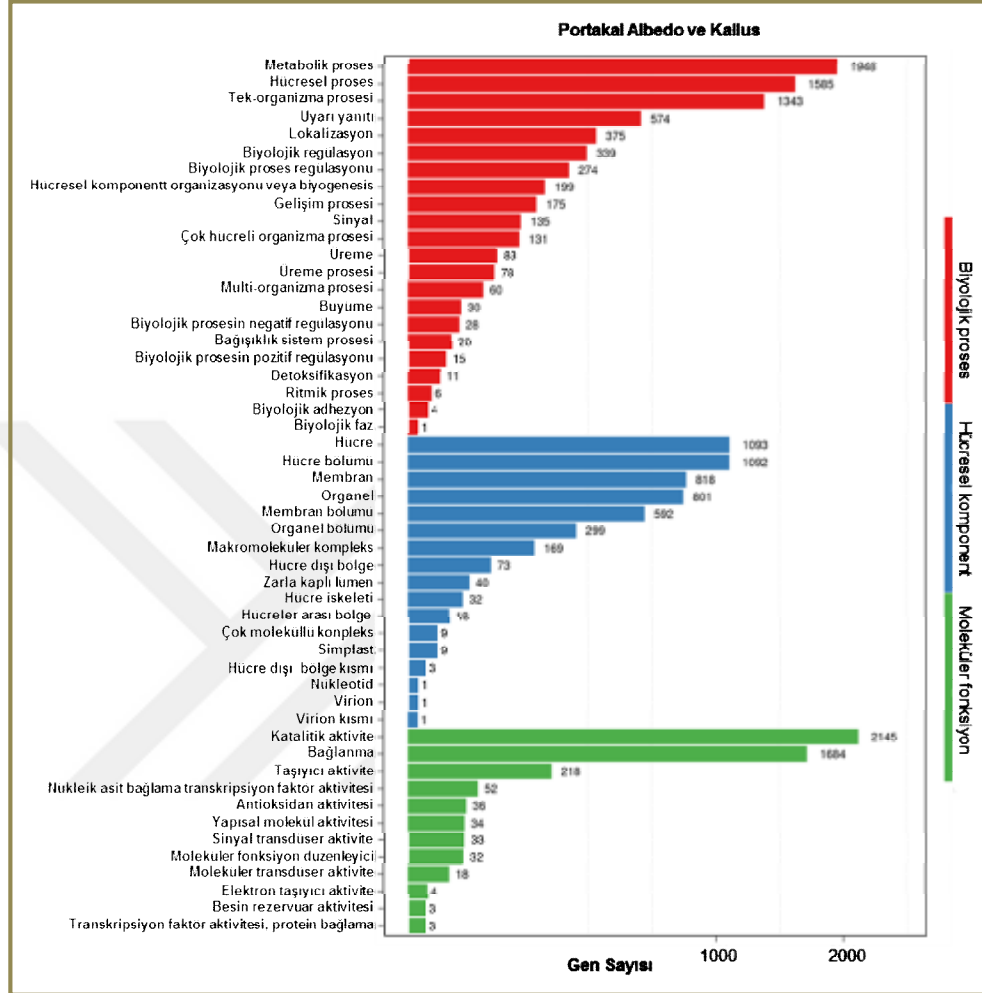
Şekil 4.14. Farklı ifade olan genlerin örnekler arasındaki HeatMap görüntüleri. 1. Portakal albedo, 2. Altıntop albedo ve 3. Kallus

4.4.2.3. Farklı Seviyelerde İfade Olan Genlerin Ontoloji (GO) Analizleri

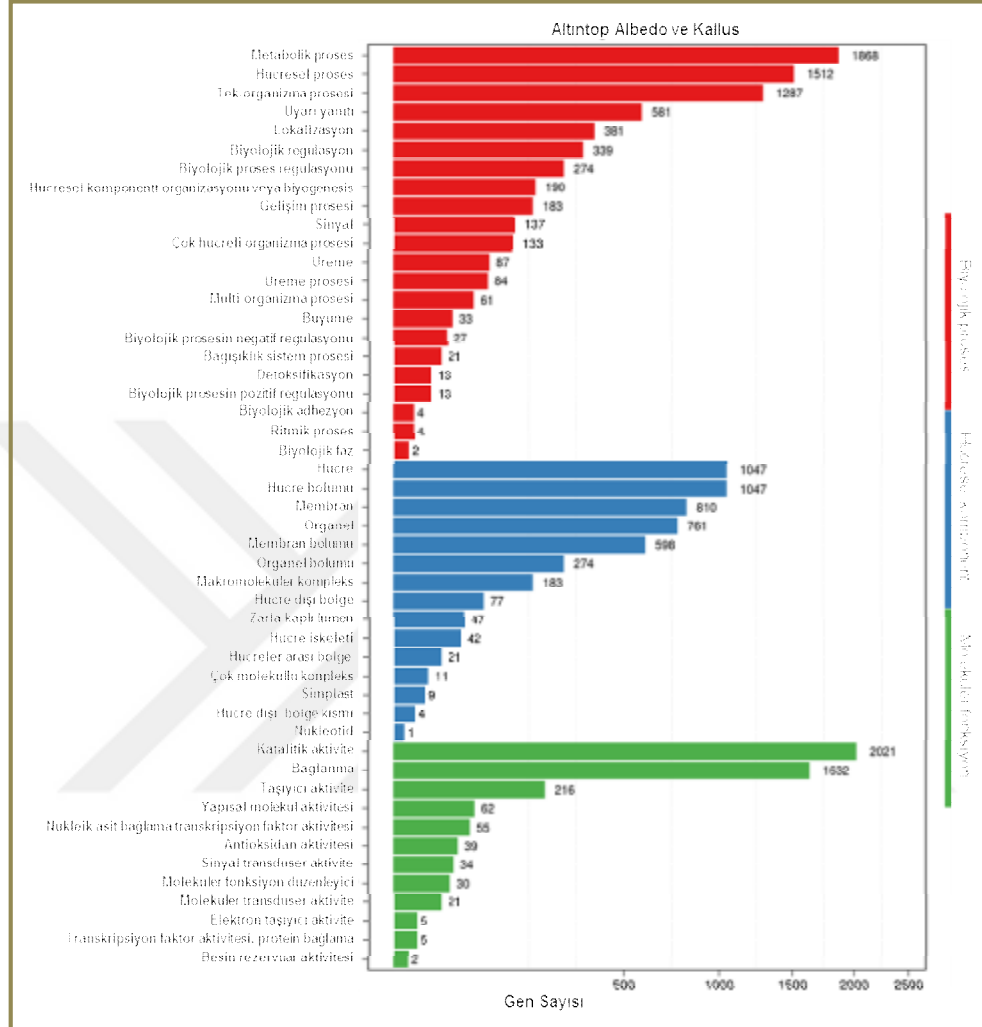
Gen Ontoloji veya GO, tüm türler arasındaki gen ve gen ürünleri niteliklerinin temsilini birleştirmek için yapılan bir biyobilişim girişimi olarak tanımlanmaktadır. GO analizleri sayesinde genom ekspresyon çalışmalarında biyolojik süreçleri vurgulamak amacı ile sıklıkla kullanılmaktadır. GO, 3 ontolojiye sahiptir. Bunlar; moleküler biyolojik fonksiyon, hücresel komponent ve biyolojik süreçtir (Young ve ark., 2010). Örneklere ait farklı seviyelerde ifade edilen genlerin ontoloji analizleri gerçekleştirilmiş ve oluşturulan ontoloji şemaları Şekil 15-17’de detaylı olarak sunulmuştur.



Şekil 4.15. Portakal albedo ve altıntop albedo örnekleri arasında oluşturulan gen ontoloji şeması



Şekil 4.16. Portakal albedo ve kallus örnekleri arasında oluşturulan gen ontoloji şeması



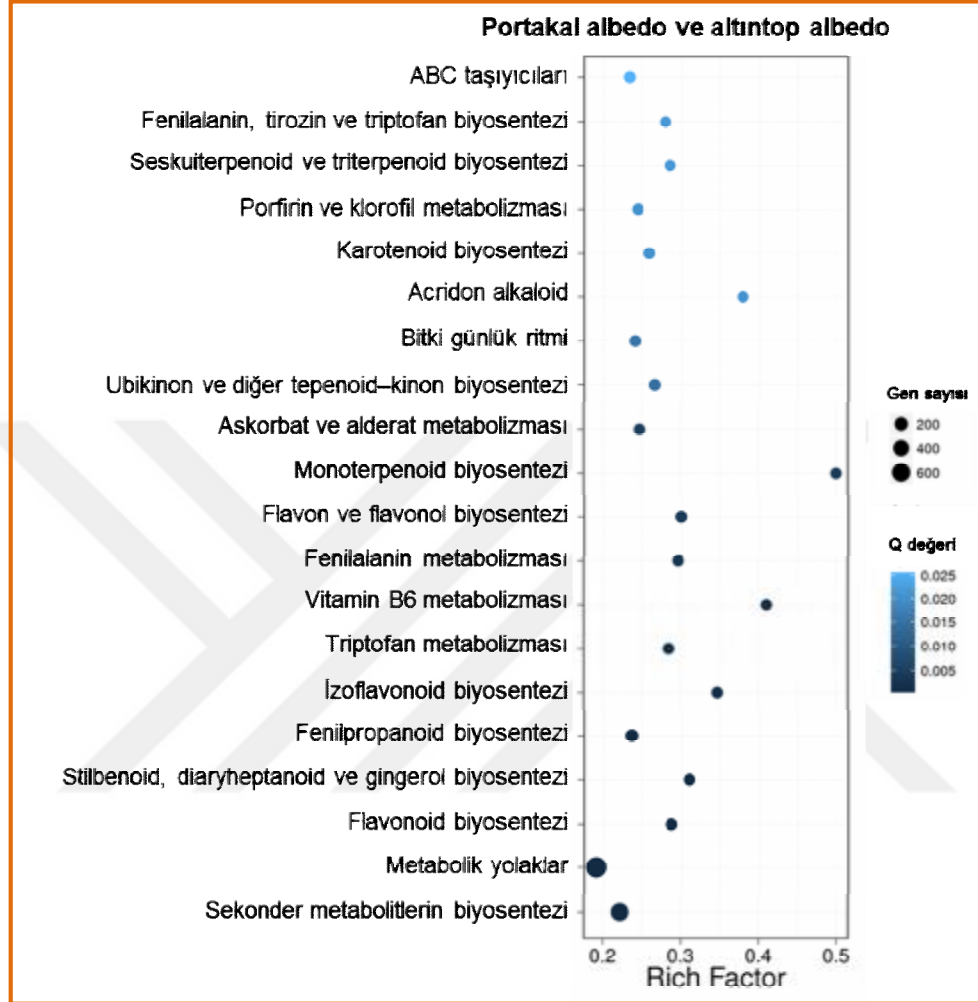
Şekil 4.17. Altıntop albedo ve kallus örnekleri arasında oluşturulan gen ontoloji şeması

Yürütülen GO analizleri sonucunda elde edilen genler temel olarak biyolojik proses, hücresel komponent ve moleküler fonksiyon altında gruplandırılmıştır. Biyolojik proses içerisinde metabolik ve hücresel prosesin en yüksek gen miktarına sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu iki prosesin portakal albedo ile kallus arasında diğerlerine göre daha yüksek miktarda gen içerdiği tespit edilmiştir. Diğer bir sınıflandırma olan hücresel komponentte ise hücre ve hücre

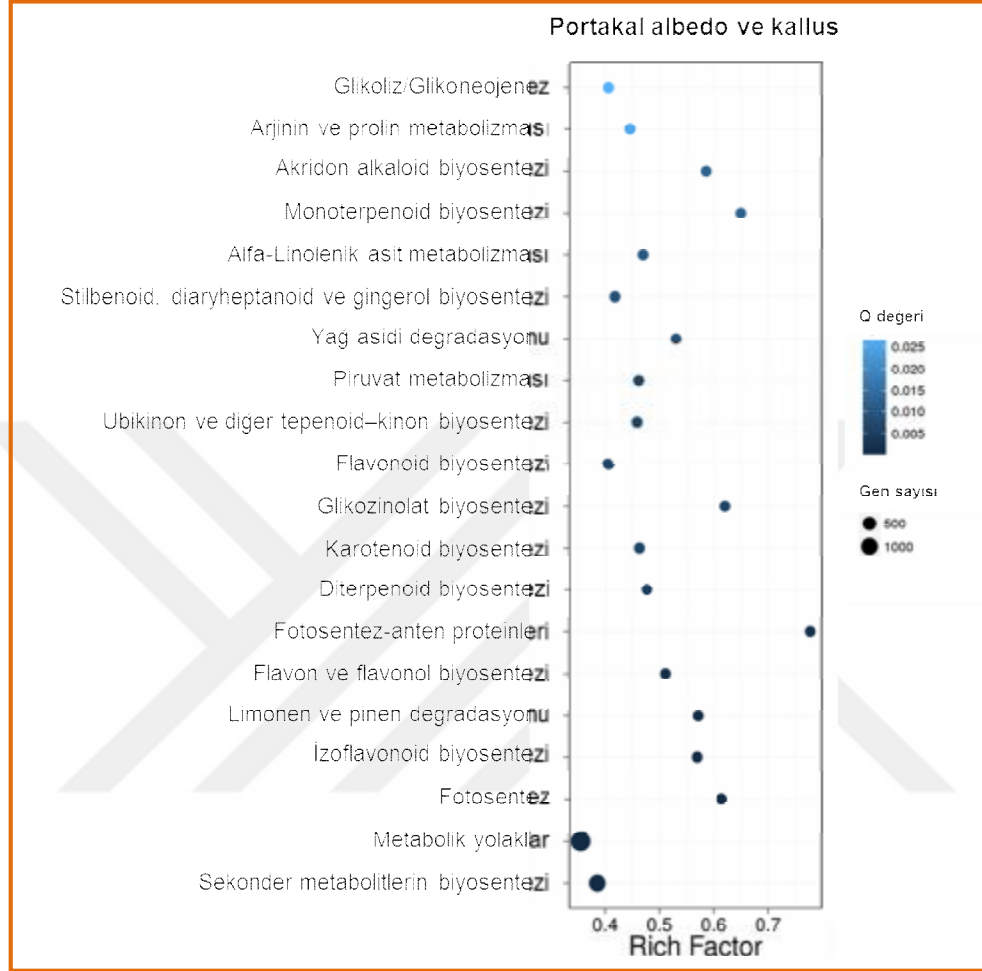
bölümünün en fazla geni içerdği belirlenmiştir. İçerdikleri gen sayılarının da aynı olduğu gözlemlenmiştir. Moleküler fonksiyon sınıflandırılması içerisinde katalitik aktivite ve bağlanma grubunun daha yüksek gene sahip olduğu tespit edilmiştir. Wang ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada Nahşi armuduna (*Pyrus pyrifolia*) ait meyve pigmentasyonunda görev alan genleri RNA-seq yöntemi ile araştırmışlardır. GO analizleri ile hücresel komponent ve biyolojik proses ile ilişkili 123 geni tespit etmişlerdir. Yu ve ark. (2012) ise portakalda (*Citrus sinensis*) yürüttükleri transkriptom çalışmalarında GO analizlerine göre protein bağlama, hidroliz aktivitesi, transferaz aktivitesi ve taşıyıcı aktivite ile ilişkili genlerin varlığını tespit etmişlerdir.

4.4.2.4. Farklı Seviyelerde İfade Olan Genlerin Yolak Analizleri

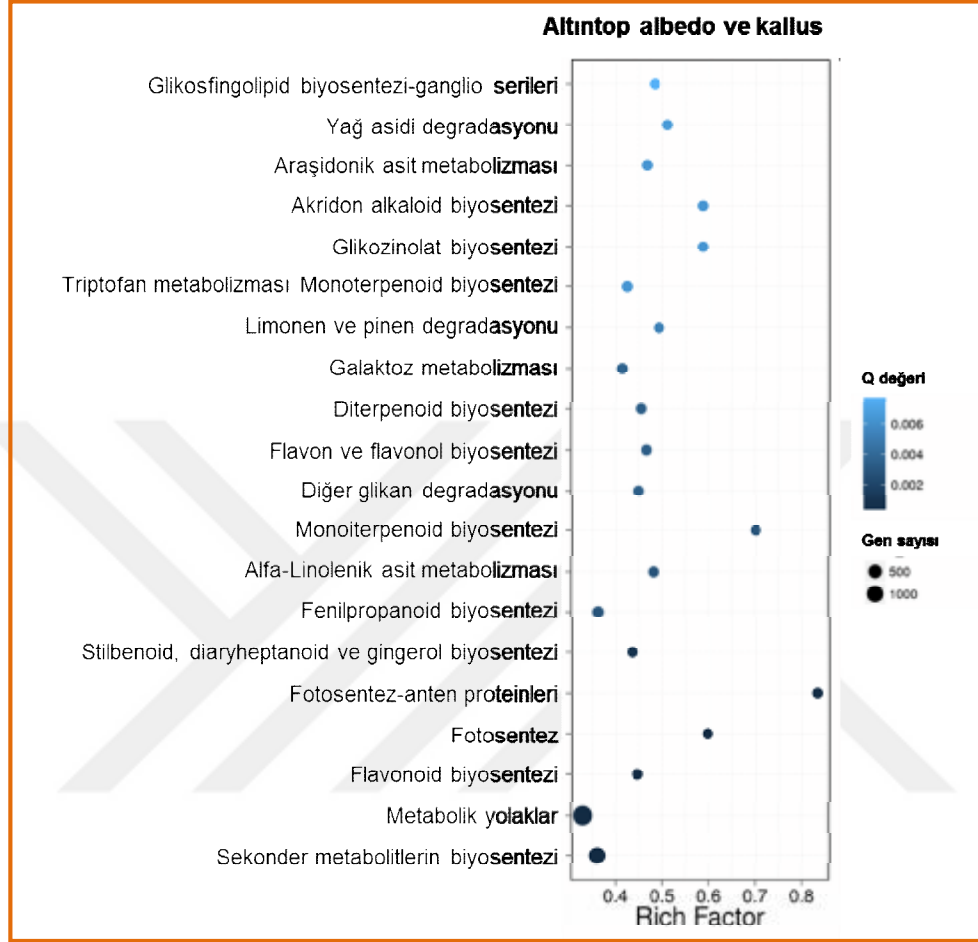
Analizler sonucu farklı seviyelerde ifade olan genlerin yolak analizleri çalışmalar kapsamında yapılmıştır. KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) veri bankası kullanılarak genlerin hangi yolaklarda görev aldığı belirlenmiştir. Örnekler arasında aktif olan genlerin hangi yolaklarda görev aldığı Şekil 4.18-20’de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.18. Portakal albedo ile altıntop albedo örnekleri arasındaki genlerin katıldığı yollar



Şekil 4.19. Portakal albedo ile kallus örnekleri arasındaki genlerin katıldığı yollar



Şekil 4.20. Altıntop albedo ile kallus örnekleri arasındaki genlerin katıldığı yollar

KEGG veri bankası kullanılarak gerçekleştirilen analizlere göre örnekler arasında birçok yolağın varlığı tespit edilmiştir. Sekonder metabolit biyosentezi ile metabolik yolların tüm örnekler arasında var olduğu tespit edilmiştir. Önemli sekonder metabolitler arasında flavonoidlerin biyosentezi ile ilişkili yolların varlığı tüm örnek kombinasyonları arasında belirlenmiştir. Örnekler arasında farklı seviyelerde ifade olan genlerin katıldığı yollar ve ilgili genlerin sayısı Çizelge 4.27-29'da verilmiştir.

Çizelge 4.27. Portakal albedo ve altıntop albedo örnekleri arasında tespit edilen önemli yollardan bazıları

Yolak	DEG'lerin yolak anotasyonları	Tüm genlerin yolak anotasyonları	Qvalue	Yolak ID
Sekonder metabolit biyosentezi	552 (19.15%)	2487 (13.05%)	6,08E-16	ko01110
Metabolik yollar	792 (27.47%)	4153 (21.8%)	1,88E-07	ko01100
Flavonoid biyosentezi	71 (2.46%)	247 (1.3%)	1,29E+00	ko00941
Stilbenoid, diarylheptanoid ve gingerol biyosentezi	55 (1.91%)	177 (0.93%)	2,01E+00	ko00945
Fenilpropanoid biyosentezi	124 (4.3%)	524 (2.75%)	3,41E+00	ko00940
İzoflavonoid biyosentezi	25 (0.87%)	72 (0.38%)	6,61E+02	ko00943
Triptofan metabolizması	37 (1.28%)	130 (0.68%)	1,34E+03	ko00380
Flavon ve flavonol biyosentezi	27 (0.94%)	90 (0.47%)	3,18E+03	ko00944
Monoterpenoid biyosentezi	10 (0.35%)	20 (0.1%)	3,18E+03	ko00902
Karotenoid biyosentezi	28 (0.97%)	108 (0.57%)	2,01E+04	ko00906
Limonen ve pinen degradasyonu	17 (0.59%)	63 (0.33%)	5,48E+04	ko00903
Seskiterpenoid ve triterpenoid biyosentezi	20 (0.69%)	70 (0.37%)	2,10E+04	ko00909
Fotosentez	14 (0.49%)	62 (0.33%)	2,54E+05	ko00195

Çizelge 4.28. Portakal albedo ve kallus örnekleri arasında tespit edilen önemli yollardan bazıları

Yolak	DEG'lerin yolak anotasyonları	Tüm genlerin yolak anotasyonları	Qvalue	Yolak ID
Sekonder metabolit biyosentezi	959 (16.52%)	2487 (13.05%)	2,08E-12	ko01110
Metabolik yollar	1473 (25.37%)	4153 (21.8%)	1,74E-07	ko01100
Fotosentez	38 (0.65%)	62 (0.33%)	2,26E+01	ko00195
İzoflavonoid biyosentezi	41 (0.71%)	72 (0.38%)	9,31E+01	ko00943
Limonen ve pinen degradasyonu	36 (0.62%)	63 (0.33%)	2,68E+02	ko00903
Flavon ve flavonol biyosentezi	46 (0.79%)	90 (0.47%)	7,53E+02	ko00944
Diterpenoid biyosentezi	48 (0.83%)	101 (0.53%)	3,90E+03	ko00904
Karotenoid biosynthesis	50 (0.86%)	108 (0.57%)	5,57E+03	ko00906
Flavonoid biyosentezi	100 (1.72%)	247 (1.3%)	5,57E+03	ko00941
Alfa-linolenik asit metabolizması	39 (0.67%)	83 (0.44%)	9,50E+03	ko00592
Monoterpenoid biyosentezi	13 (0.22%)	20 (0.1%)	1,16E+04	ko00902
ABC taşıyıcıları	64 (1.1%)	158 (0.83%)	2,79E+04	ko02010
Zeatin biyosentezi	21 (0.36%)	43 (0.23%)	5,14E+04	ko00908
RNA polimeraz	56 (0.96%)	192 (1.01%)	9,35E+05	ko03020
Bitki hormonu sinyal transdüksiyonu	206 (3.55%)	645 (3.39%)	4,26E+05	ko04075
Linolenik asit metabolizması	24 (0.41%)	68 (0.36%)	4,39E+05	ko00591

Çizelge 4.29. Altıntop albedo ve kallus örnekleri arasında tespit edilen önemli yollardan bazıları

Yolak	DEG'lerin yolak anotasyonları	Tüm genlerin yolak anotasyonları	Qvalue	Yolak ID
Sekonder metabolit biyosentezi	892 (16.21%)	2487 (13.05%)	4,71E-08	ko01110
Metabolik yollar	1367 (24.84%)	4153 (21.8%)	5,16E-03	ko01100
Flavonoid biyosentezi	110 (2%)	247 (1.3%)	4,76E+00	ko00941
Fotosentez	37 (0.67%)	62 (0.33%)	1,42E+01	ko00195
Alfa-linolenik asit metabolizması	40 (0.73%)	83 (0.44%)	2,49E+03	ko00592
Monoterpenoid biyosentezi	14 (0.25%)	20 (0.1%)	2,49E+03	ko00902
Flavon ve flavonol biyosentezi	42 (0.76%)	90 (0.47%)	3,04E+03	ko00944
Galaktoz metabolizması	71 (1.29%)	172 (0.9%)	3,34E+03	ko00052
Limonen ve pinen degradasyonu	31 (0.56%)	63 (0.33%)	4,98E+03	ko00903
Akridon alkaloid biyosentezi	17 (0.31%)	29 (0.15%)	6,08E+03	ko01058
Karotenoid biyosentezi	44 (0.8%)	108 (0.57%)	3,03E+04	ko00906
ABC taşıyıcıları	60 (1.09%)	158 (0.83%)	4,13E+04	ko02010
Linoleik asit metabolizması	29 (0.53%)	68 (0.36%)	4,90E+04	ko00591
İzoflavonoid biyosentezi	30 (0.55%)	72 (0.38%)	5,93E+04	ko00943
Zeatin biyosentezi	17 (0.31%)	43 (0.23%)	2,10E+05	ko00908
Antosiyanin biyosentezi	3 (0.05%)	16 (0.08%)	1,00E+06	ko00942
RNA polimeraz	45 (0.82%)	192 (1.01%)	1,00E+06	ko03020

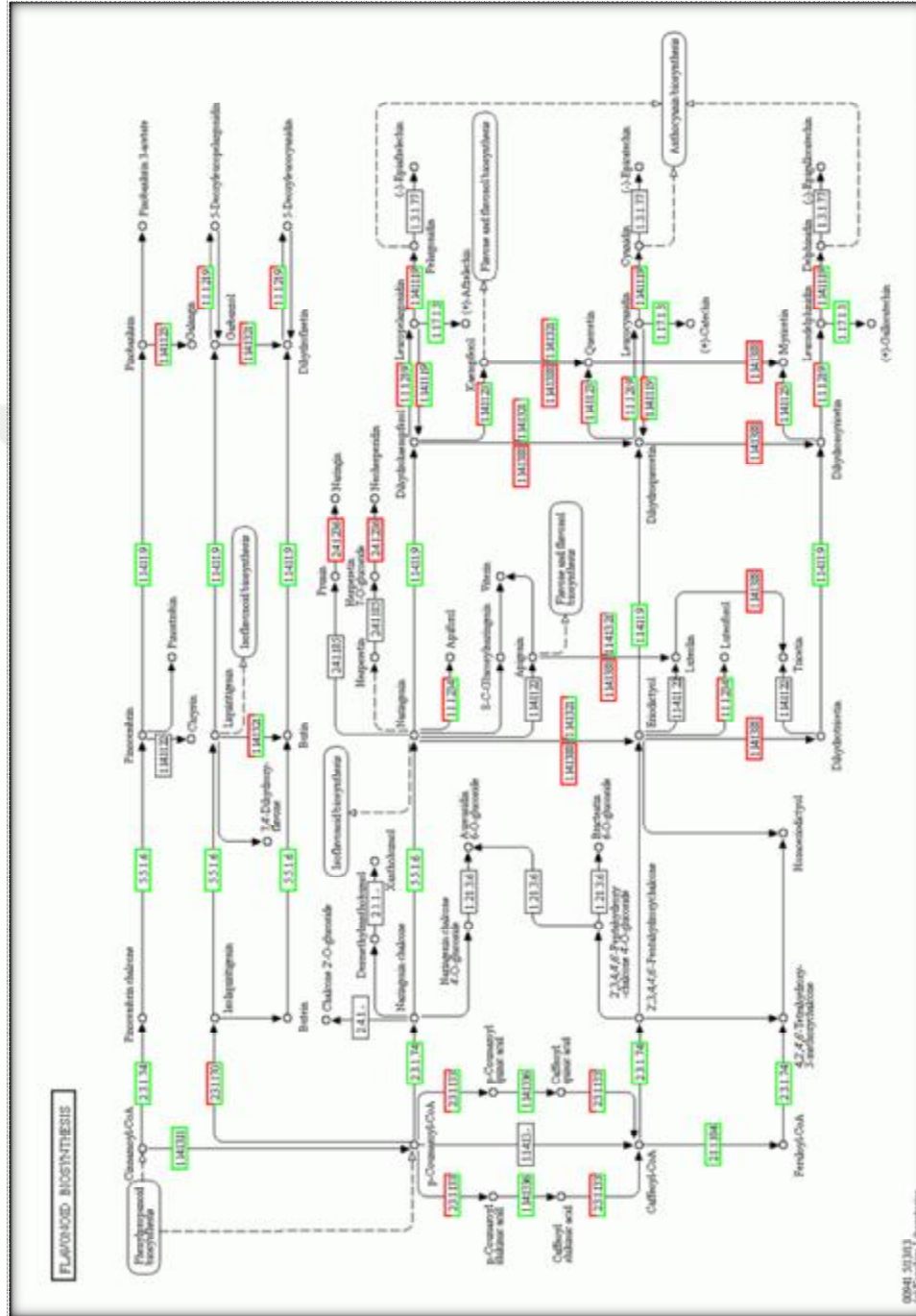
Portakal albedo, altıntop albedo ve kallus örnekleri arasında tespit edilen önemli yolaklardan bazıları EK 3, 4, 5'te verilmiştir. Ayrıca bu yolaklar içerisinde farklı seviyelerde ifade olan genlerin listeleri ise EK 6, 7, 8'de sunulmuştur. Örnekler arasında sekonder metabolit sentezi ile ilişkili birçok yolak ve bu yolaklarda görev alan genler yürütülen çalışmalar kapsamında belirlenmiştir.

Mu ve ark. (2012) *Betula platyphylla*'nın fenotipik değişimlerine ait transkriptomik analizlerini araştırmışlardır. Fenotipik değişimlerin daha iyi anlaşılabilmesi için araştırmacılar, KEGG yolak analizini kullanmışlardır. Farklı seviyelerde ifade olan toplam 3437 geni 122 KEGG yolak içerisinde belirlemişlerdir. Çalışmalarında autotetraploidler ve diploidler arasında en belirgin farklılık gösteren yolakların, stilbenoid, diarilheptanoid ve gingerol biyosentezi (Ko00945), limonen ve pinen degradasyon (Ko00903), fenilpropanoid biyosentezi (Ko00940), amino şeker ve nükleotid şeker metabolizması (Ko00520), flavonoid biyosentezi (Ko00941), sekonder metabolitlerin (Ko01110) biyosentezi, bitki hormonu sinyal iletimi (Ko04075) ve fenilalanin metabolizmasını (Ko00360) izleyen bitki patojen etkileşimleri (Ko04626) olduğunu tespit etmişlerdir. Liang ve ark. (2015) yürüttükleri çalışmada pomelonun (*Citrus grantis*) *de novo* transkriptom analizlerini Illumina teknolojisini kullanarak gerçekleştirmişlerdir. KEGG veri tabanını kullanarak 57212 unigeni açıklamışlardır. Elde edilen sonuçlara göre, 23219 unigeni 5 ana kategori ve 128 KEGG yolak içerisinde haritalamışlardır. Genlerin çoğunun (19780; %85.19) metabolizma kategorisinde olduğunu belirlemişlerdir. Bu kategori içerisinde karbonhidrat metabolizması, lipid metabolizması ve sekonder metabolitlerin biyosentezinin en çok temsil edilen alt kategoriler olduğunu tespit etmişlerdir. Farklı bir çalışmada Yu ve ark. (2015) mandarinde uçucu ve uçucu olmayan bileşenlerin üretimini daha iyi açıklamak amacı ile proteomik ve metabolomik analizleri gerçekleştirmişlerdir. KEGG analizlerine göre 48 metabolik yolak içerisinde 46 farklı şekillerde ifade edilen proteini belirlemişlerdir. Tanımlanan biyosentetik yolakların çoğunun glikoliz,

sitrik asit döngüsü, şeker sentezi, amino asit sentezi ve terpen sentezi ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir.

Yapılan çalışmalara benzer olarak tez çalışması kapsamında yürütülen yolak analizlerine göre örnekler arasında stilbenoid, diarylheptanoid ve gingerol biyosentezi, limonen ve pinen degradasyonu, linoleik asit metabolizması, karotenoid biyosentezi, zeatin biyosentezi, akridon alkaloid biyosentezi, flavon ve flavonol biyosentezi gibi önemli yolaklar tespit edilmiştir. Ayrıca alfa-linolenik asit metabolizması, diterpenoid biyosentezi gibi birçok yolağın kallus ile ilişkili örnekler arasında var olduğu belirlenmiştir.

Fenolik bileşiklerin en büyük sınıfını oluşturan flavonoidler oldukça önemli sekonder metabolitler arasındadır. Tüm örnekler arasında flavonoid biyosentezi yolağı tespit edilmiştir. Bunlar arasında portakal albedo ve altıntop albedo arasında flavonoid biyosentezi yolağı Şekil 4.21’de sunulmuştur. Flavonoid biyosentezi yolağı içerisinde up regüle (kırmızı renkli) ve down regüle (yeşil renkli) olan genler farklı renkli çerçeveler içerisinde gösterilmiştir.



Şekil 4.21. Portakal albedo ve altıntop albedo arasında respit edilen flavonoid biyosentezi yolu

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Temel yaşamsal fonksiyonları ile doğrudan ilişkisi olmamasına karşın sekonder metabolitler, bitkinin stres koşullarında çevresel uyumu için önemli görevler üstlenmektedir. Bitkiler, hayvanlar, mikroorganizmalar ve böcekler arasındaki etkileşimleri düzenleyen ekolojik bir role sahiptirler. Ek olarak bitki sekonder metabolitlerinin gıda, kozmetik, tekstil, kimya ve ilaç endüstrisinde de oldukça fazla kullanım alanı bulunmaktadır. İnsan beslenmesinde önemli bir yere sahip turuncgiller, sekonder metabolitler bakımından da oldukça zengindir. Sekonder metabolitlerin büyük bir kısmını oluşturan fenolik bileşikler ile terpenler, turuncgil meyvelerinin önemli bileşenleridir. Turuncgillerin işlenmesi sonucu ortaya çıkan meyve kabukları, terpenlerin büyük bir bölümünü oluşturan esansiyel yağlar için değerlendirilmektedir. Ekonomik olarak değerli olan bu yağların elde edilmesi için farklı metotlardan faydalanılmaktadır. Bu tez çalışmasında ilk olarak farklı turuncgil meyvelerine ait (Satsuma mandarini, Klemantin mandarini, Meyer limonu, İnterdonat limonu, Kan portakalı ve Turunç) kabuklardan klasik yöntemler kullanılarak esansiyel yağ üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla distilasyon yöntemi kullanılmış ve yağ verimini artırmak için kabuklara bazı ön işlemler (küçük parçalara ayırma, blender ile öğütülme ve kurutularak küçük parçalara ayırma) uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek esansiyel yağ verimi mL/g olarak ‘Washington Navel’ (%4.0) ve ‘Moro’ kan portakalında (%4.6) tespit edilmiştir. Ön işlemler içerisinde ise tüm meyve kabukları için blender ile öğütmenin oldukça iyi bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır. Özellikle küçük parçalara ayırma işlemi ile karşılaştırıldığında tüm meyve kabuklarının yağ verimi 2 ile 22 kat oranında artış göstermiştir. Elde edilen esansiyel yağların kimyasal bileşimleri GC-MS kullanılarak belirlenmiştir. Tüm yağlarda en yüksek bileşiğin D-limonen olduğu ve turuncgiller için majör bileşik olarak tanımlanabileceği kanıtlanmıştır. D-limonen miktarı meyvelere göre %66.58 ile %93.32 arasında

değişkenlik göstermiştir. Moro kan portakalının hem yağ veriminin hem de D-limonen miktarının diğer çeşitlere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Tez çalışmasının devamında sekonder metabolitlerin biyoteknolojik yöntemlerle üretilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla yağ verimi yüksek ‘Washington Navel’ portakal ile ‘Star Ruby’ altıntop meyvelerinden kallus kültürü çalışmaları yürütülmüştür. Farklı bitki büyüme düzenleyicileri ile desteklenmiş 12 MT ortamı ile meyvelere ait eksplantlar (Albedo, kabuk ve meyve kesiti) kullanılmıştır. Kalluslar, aydınlık (16/8 saat aydınlık/karanlık) ile tamamen karanlık kültür koşullarında geliştirilmiştir. Aydınlık koşullarda hem kallus oluşumu (%36.26) hem de ağırlık farkına (0.24g) göre en iyi meyvenin portakal olduğu bulunmuştur. Bunun aksine karanlık koşullarda ise altıntop, gelişim (%56.48) ve ağırlık farkı (0.79g) yönünden daha iyi sonuç vermiştir. Kallusların % gelişimleri ile ağırlık farklarının değerlendirilmesi sonucu en iyi gelişim, albedo eksplantında (karanlık için %81.71, aydınlık için %52.31) gözlenirken, kabuk eksplantında kallus gelişimi (< %1) tespit edilememiştir.

Kallus ağırlık farkı ve gelişimi ortamlar düzeyinde değerlendirildiğinde, 12 kombinasyondan dördü en iyi sonuç vermiştir. Kallus gelişimlerine göre kinetin 0.1 mg/L+2,4D 0.1 mg/L, kinetin 0.1 mg/L+2,4D 2.0 mg/L, kinetin 1.0 mg/L+2,4D 1.0 mg/L ve kinetin 5.0 mg/L+2,4D 1.0 mg/L içeren ortamın iyi sonuç verdiği bulunmuştur. Sonuç olarak kallus gelişiminde birçok faktörün etkisi tespit edilmiştir. Buna göre tüm veriler değerlendirildiğinde en başarılı eksplantın albedo olduğu tespit edilmiştir. Kültür koşullarının kallus gelişimindeki etkisi meyvelere göre farklılık göstermiş ve karanlığın genel olarak kallus gelişiminde daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Başarılı kallus gelişimleri ile tez çalışmasında kallusların fenolik bileşik ve naringin üretebilme kapasiteleri araştırılmıştır. İki meyveye ait eksplantlar, (albedo ve meyve kesiti) seçilen dört ortamda kültüre alınarak ortam ve kültür koşullarının etkisi belirlenmiştir. Portakal kalluslarında hem toplam fenolik bileşik hem de naringin miktarına aydınlık koşulların pozitif etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca albedo eksplantı için hem karanlık (1.411 mg/g) hem de aydınlık koşullarda (1.530 mg/g) en yüksek fenolik bileşik miktarı tespit edilmiştir. Benzer olarak naringin miktarında da aydınlık kültür koşulları ile albedo eksplantı (0.103-0.096 mg/g) daha yüksek sonuç vermiştir. Toplam fenolik ve naringin miktarlarına göre aydınlık ve karanlık koşullar değerlendirildiğinde ortam O4 ile O3'ün daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir. Kültür koşullarına göre değişkenlik gösterse de ideal kültür süresinin 1. ve 3. altkültür olduğu tespit edilmiştir.

Altıntop eksplantlarından gelişen kalluslarda albedonun (1.943-1.429 mg/g) ve ortam O3 ile O4'ün toplam fenolik bileşik miktarı bakımından en yüksek değerde olduğu bulunmuştur. Farklı olarak albedo için karanlık koşulların (1.943 mg/g), meyve kesiti için ise aydınlık koşulların (1.606 mg/g) daha uygun olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Naringin miktarına göre ise eksplantlar arasında önemli bir fark gözlenmezken, kültür koşulları fenolik bileşikte olduğu gibi farklılık göstermiştir. Ortamlardan O3 ve O4'ün, naringin miktarı için de uygun olduğu tespit edilirken, 1. altkültürün her iki bileşik için en yüksek değerde olduğu gözlemlenmiştir.

Sekonder metabolitlerin biyoteknolojik üretim çalışmalarının devamında dört ortamdan bir tanesi seçilmiştir. Seçilen O3 ortamı, fenolik bileşik ve naringin üretiminin iyileştirilmesi amacı ile kullanılmış ve farklı elisitör (Sakkaroz ve MeJA) denemeleri yapılmıştır. Sakkaroz denemeleri incelendiğinde; portakal için fenolik bileşik ve naringin miktarına göre aydınlık koşullarda meyve kesiti kallusları, karanlık koşullarında ise albedo kallusları daha iyi sonuç vermiştir. Toplam 30 g/L sakkaroz içeren ortam O3 ile 2. ve 3. altkültürün daha yüksek değerde olduğu tespit edilmiştir. Portakal albedo kallusları için fenolik ve naringin miktarına göre karanlık kültür koşulları ile 20 g/L sakkaroz içeren S1 ortamının daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Meyve kesiti kallusları için ise aydınlık koşullar ile O3 ortamının daha yüksek fenolik ve naringin miktarına sahip olduğu gözlemlenmiştir. Her iki kallus için 2. ve 3. altkültürün yüksek değerde sonuç verdiği tespit edilmiştir.

Portakal eksplantları ayrı ayrı değerlendirildiğinde ise albedo eksplantından gelişen kalluslardaki toplam fenolik ve naringin miktarı bakımından karanlık kültür koşulları ile S1 ortamının daha iyi olduğu tespit edilmişken, 2. ve 3. altkültürün ideal kültür süreleri olduğu belirlenmiştir. Meyve kesiti eksplantından gelişen kalluslar için ise aydınlık kültür koşulları ile O3 ortamının hem toplam fenolik hem de naringin miktarı açısından daha yüksek değerde olduğu tespit edilmiştir. Albedo eksplantından gelişen kalluslarda olduğu gibi burada da 2. ve 3. altkültürün her iki analiz için ideal kültür süresi olduğu belirlenmiştir.

Altıntop eksplantlarından gelişen kalluslara ait aydınlık kültür koşulu verileri değerlendirildiğinde S1 ortamı ile 1. alt kültürün hem toplam fenolik hem de naringin miktarı bakımından yüksek sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Fenolik bileşik miktarına göre albedodan gelişen kallusların, naringin miktarına göre ise meyve kesitinden gelişen kallusların daha uygun olduğu bulunmuştur. Karanlık kültür koşullarında ise 1. altkültür ile O3 ortamının her iki analiz için yüksek miktarda olduğu belirlenmiştir. Her iki analiz sonuçlarına göre karanlık kültür koşullarında eksplantlardan gelişen kalluslar arasında fark tespit edilmemiştir.

Altıntop eksplantları ayrı ayrı değerlendirildiğinde, albedodan gelişen kalluslarda aydınlık kültür koşulları toplam fenolik miktarı için, karanlık kültür koşulları ise naringin miktarı için daha uygun olduğu gözlemlenmiştir. Her iki analiz sonuçlarına göre S1 ortamı ile 2. altkültürün daha başarılı olduğu belirlenmiştir. Meyve eksplantından gelişen kalluslar için her iki analize göre elde edilen sonuçların benzer olduğu tespit edilmiştir. Buna göre karanlık ve aydınlık kültür koşulları arasında fark gözlemlenmezken ortam O3 ile 1. altkültürün yüksek miktarda sonuç verdiği belirlenmiştir.

MeJA ile yapılan elisitör uygulamalarına göre; aydınlık kültür koşullarında gelişen portakal kallusları değerlendirildiğinde hem toplam fenolik hem de naringin miktarına göre meyve kesiti eksplantının daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir. Karanlık kültür koşullarında ise albedo eksplantının her iki analiz için yüksek değerde sonuç verdiği tespit edilmiştir. Her iki analiz sonuçlarına göre

kültür koşulları beraber değerlendirildiğinde 2. altkültür ile MJ2'nin yüksek değerde olduğu tespit edilmiştir.

Portakal eksplantları MeJA uygulaması için ayrı ayrı değerlendirildiğinde hem albedodan gelişen kalluslar hem de meyve kesitinden gelişen kalluslarda aydınlık kültür koşulları ile MJ2 ortamının en yüksek fenolik bileşik miktarına sahip olduğu tespit edilmiştir. Kültür süresi için ise albedoda 3. altkültür, meyve kesitinde ise 2. altkültürün daha uygun olduğu gözlemlenmiştir. Naringin miktarına göre ise, meyve ve albedo eksplantından gelişen kalluslarda aydınlık kültür koşulları, ortam MJ2 ve 3. altkültürün en yüksek miktarda olduğu belirlenmiştir.

Toplam fenolik bileşik miktarına göre; altıntop eksplantlarından gelişen kalluslarda hem aydınlık hem de karanlık kültür koşullarında albedo eksplantının uygun olduğu tespit edilmiştir. İki eksplanttan gelişen kalluslarda MJ2 ile 1. altkültürün yüksek fenolik miktarına sahip olduğu belirlenmiştir. Naringin miktarına göre aydınlık ve karanlık kültür koşullarında albedo ekplantı ile MJ2 ortamının daha iyi sonuç verdiği tespit edilmiştir. Kültür süresi olarak ise 1. altkültürün her iki eksplant için daha uygun olduğu belirlenmiştir.

Altıntop eksplantlarından gelişen kalluslar ayrı ayrı değerlendirildiğinde ise her iki eksplanttan gelişen kalluslarda aydınlık kültür koşulları, 1. altkültür ve MJ2 ortamının en yüksek fenolik bileşik miktarına sahip olduğu belirlenmiştir. Naringin miktarı bakımından her iki eksplanttan gelişen kalluslarda aydınlık kültür koşulları ile 1. altkültürün daha yüksek miktarda sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Ortamlar içerisinde ise albedo için MJ2, meyve kesiti için ise O3 ortamının daha yüksek değerde olduğu tespit edilmiştir.

HPLC analizleri ile elde edilen naringin miktarları Davis testi sonuçları ile benzerlik göstermiştir. Davis testinin yaklaşık 1.07-2.52 kat fazla sonuç verdiği belirlenmiştir. Daha ekonomik ve kullanılabilirliği kolay olan Davis testinin naringin analizlerinde rahatlıkla uygulanabileceği sonucuna varılmıştır.

Elisitör uygulamaları ile yürütülen süspansiyon hücre kültürü çalışmaları aydınlık kültür koşullarında 20 gün boyunca takip edilerek toplam fenolik bileşik

ve naringin miktarları belirlenmiştir. Albedo kallusları ile yürütülen bu çalışmanın sonuçlarına göre, portakal kalluslarında sakkaroz uygulamaları için S1 ile S2 ortamı ve MeJA uygulamaları için de MJ2 ortamlarının hem fenolik hem de naringin miktarı yönünden yüksek değere sahip olduğu tespit edilmiştir. Her iki uygulama ve analiz sonuçları için 20. günün ideal kültür süresi olduğu belirlenmiştir. Altıntop kalluslarına göre ise sakkaroz uygulamaları için S2 ortamı ile 15. gün kültür süresinin, MeJA uygulamalarına göre ise MJ2 ortamı ile 15. günlük kültür süresinin her iki analiz bakımından en yüksek miktarda sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Sonuç olarak süspansiyon hücre kültürü çalışmalarında, toplam fenolik ve naringin miktarındaki artışın sakkaroz ile MeJA'nın artan konsantrasyonlarıyla doğru orantılı olduğu tespit edilmiştir.

Tez çalışmasının devamında altıntop albedo, portakal albedo ve altıntop albedo dokusundan gelişen kallus örneklerine ait RNA'ların sekans analizleri gerçekleştirilerek sekonder metabolit üretiminden sorumlu olan aktif genler belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre toplam 47.51 ile 49.78 Mb arasında ham okuma elde edilmiştir. Toplam temiz okumaların ise 44.89-46.02 Mb arasında olduğu belirlenmiş ve temiz okuma oranının da %92.45 ile %95.61 arasında olduğu tespit edilmiştir.

Portakal albedo ve altıntop albedo örnekleri arasında toplam 18319 genin ortak ifade olduğu tespit edilirken, altıntop albedo ile kallus örneğinde toplam 17945 genin ortak ifade edildiği belirlenmiştir. Portakal albedo ve kallus arasında ise 17879 genin ortak ifade edildiği gözlemlenmiştir. DEG analizleri sonucunda portakal albedo ve altıntop albedo arasında toplam 3661 gen tespit edilmiş ve bunların 1778'inin up-regüle, 1883'ünün de down-regüle olduğu belirlenmiştir. Portakal albedo ile kallus arasında ise 7513 gen tespit edilirken bunların 3114'ünün up-regüle, 4399'unun ise down-regüle olduğu gözlemlenmiştir. Altıntop albedo ve aynı dokudan gelişmiş olan kallus arasında toplam 7070 gen tespit edilmiştir. Meyveler arasındaki analizlerden ziyade kallus ile yapılan çalışmalarda daha fazla gen bulunduğu yapılan analizler sonucunda tespit edilmiştir.

Örnekler arasında farklı seviyelerde ifade olan genlerin GO ve KEGG analizleri gerçekleştirilmiştir. GO analizleri sonucunda elde edilen genler, temel olarak biyolojik proses, hücresel komponent ve moleküler fonksiyon altında gruplandırılmıştır. Metabolik ve hücresel prosesin, biyolojik proses içerisinde en yüksek gen miktarına sahip olduğu belirlenmiştir. Bu iki prosesin kallus ve portakal albedo arasında diğer örneklerle göre daha fazla gen içerdiği bulunmuştur. Hücresel komponentte, hücre ve hücre bölümünün, moleküler fonksiyon sınıflandırılmasında da katalitik aktivite ve bağlanma grubunun daha fazla gene sahip olduğu tespit edilmiştir. KEGG veri bankası kullanılarak gerçekleştirilen analizler sonucunda örnekler arasında birçok yolağın varlığı tespit edilmiştir. Özellikle sekonder metabolit biyosentezi ile metabolik yolların tüm örnekler arasında var olduğu belirlenmiştir. Ek olarak flavonoid biyosentezi ile ilişkili yolların varlığı da tüm örnekler arasında tespit edilmiştir.

Oldukça fazla alanda kullanılan sekonder metabolitler çoğunlukla doğal alanlarda yetişen bitkilerden elde edilmekte ve bitkilere göre özelleşmektedir. Bu nedenle metabolitlerin miktarı ve kalitesi sürekli değişmektedir. Sekonder metabolitlerin biyoteknolojik üretimi, aynı kalitede, istenilen miktarda ve daha güvenilir ürünler sunmaktadır. Metabolitlerin sentez mekanizmaların öğrenilmesi ile de daha kontrollü ürün üretimi ve bir bitkisel materyalden birden fazla ürünün üretilmesi sağlanabilmektedir. Bitki doku ve hücre kültürleri sayesinde tüm bu üretimlerin yapılabilmesi için araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır.

Birçok önemli çalışmalar ile desteklenmiş bu tezde oldukça önemli bulgular elde edilmiştir. Turunçgillerin sahip olduğu esansiyel yağ verimleri ve kimyasal bileşikler belirlenmiştir. Turunçgil kabuklarından *in vitro* koşullarda kallus oluşturulması ve sekonder metabolit üretimi üzerinde ülkemizde benzer çalışma bulunmamaktadır. Uluslararası çalışmalar içerisinde de oldukça sınırlı sayıdadır. Bu nedenle ileride yapılacak çalışmalar için öncül bir çalışma niteliğindedir. Kallus kültürü ve hücre süspansiyon kültürleri ile sekonder metabolitlerin üretilirliği çalışmalar kapsamında önemli bulgular elde

edilmiştir. Doğru eksplant kaynağı, kültür koşulları ve sürenin ne kadar önemli olduğu vurgulanmıştır. Doğru elisitör uygulamalarının sekonder metabolit üretiminde olumlu etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Süspansiyon kültürlerinin yapılması ile de ileride biyoreaktör gibi sistemler kullanarak sekonder metabolitlerin kitlesel üretimi için önemli bir adım atılmıştır.



KAYNAKLAR

- Ahmad, M. M., Iqbal, Z., Anjum, F. M., & Sultan, J. I., 2006. Genetic Variability to Essential Oil Composition in Four Citrus Fruit Species. *Pakistan Journal of Botany*, 38(2): 319.
- Ahmad, N., Fazal, H., Abbasi, B. H., Anwar, S., Khan, M. A., Basir, A., Inayat, H., Zameer, R., Khalil S. A., Khan, K. Y., 2011. DPPH-Scavenging Antioxidant Potential in Regenerated Tissues of *Stevia rebaudiana*, *Citrus sinensis* and *Saccharum officinarum*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(14): 3293-3297.
- Alvarez, M. A., 2014. *Plant Biotechnology for Health: From Secondary Metabolites to Molecular Farming*. Springer International Publishing Switzerland, 15-25.
- Amiri, M., Gerdakaneh, M., Mamghani, R., & Nouri, F. A., 2013. Effect of Different Concentrations of 2, 4-D on Callus Induction and Callus Root Indication in 2 Explants from True Potato (*Solanum tuberosum* L.) Seeds. *Sci. J. Agron. & Plant Breed*, 1(2): 56-63.
- Anderson, L.A., Roberts, M.F., Phillipson, J.D., 1987. Studies on *Ailanthus Altissima* Cell Suspension Cultures. The Effect of Basal Media on Growth and Alkaloid Production. *Plant Cell Rep.*, 6: 239-241.
- Andrijany, V.S., Indrayanto, G., Soehono, L.D., 1999. Simultaneous Effect of Calcium, Magnesium, Copper and Cobalt on Sapogenin Steroids Content in Callus Cultures of *Agave Amaniensis*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 55: 103-108.
- Anjum, S., Abbasi, B. H., & Hano, C., 2017. Trends in Accumulation of Pharmacologically Important Antioxidant-Secondary Metabolites in Callus Cultures of *Linum usitatissimum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 129(1): 73-87.

- Atti-Santos, A.C., Rossato, M., Atti Serafini, L., Cassel, E., and Moyna, P., 2005. Extraction of Essential Oils from Lime (*Citrus latifolia* Tanaka) by Hydrodistillation and Supercritical Carbon Dioxide. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 48: 155-160.
- Audic, S., & Claverie, J. M., 1997. The Significance of Digital Gene Expression Profiles. *Genome research*, 7(10), 986-995.
- Azam, M., Jiang, Q., Zhang, B., Xu, C., and Chen, K., 2013. Citrus Leaf Volatiles as Affected by Developmental Stage and Genetic Type, *Int. J. Mol. Sci.* 14, 17744-17766.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., & Omar, A. K. M., 2013. Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials: A Review. *Journal of Food Engineering*, 117(4): 426-436.
- Baldi, A., Dixit, V.K., 2008. Enhanced Artemisinin Production by Cell Cultures of *Artemisia Annua*. *Curr. Trends in Biotechnol. Pharmacol.*, 2: 341-348.
- Baque, M. A., Elgirban, A., Lee, E. J., & Paek, K. Y., 2012a. Sucrose Regulated Enhanced Induction of Anthraquinone, Phenolics, Flavonoids Biosynthesis and Activities of Antioxidant Enzymes in Adventitious Root Suspension Cultures of *Morinda citrifolia* (L.). *Acta physiologiae plantarum*, 34(2): 405-415.
- Baque, M. A., Shiragi, M. H. K., Lee, E. J., & Paek, K. Y., 2012b. Elicitor Effect of Chitosan and Pectin on the Biosynthesis of Anthraquinones, Phenolics and Flavonoids in Adventitious Root Suspension Cultures of *Morinda citrifolia* (L.). *Australian Journal of Crop Science*, 6(9): 1349.
- Barthe, G.A., Jourdan, P.S., McIntosh, C.A., Mansell, R.L., 1987. Naringin and Limonin Production in Callus Culture and Regenerated Shoots from Citrus sp. *J. Plant Physiol.*, 127: 55-65.

- Brunet, G., & Ibrahim, R. K., 1973. Tissue Culture of Citrus Peel and Its Potential for Flavonoid Synthesis. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 69(2): 152-162.
- Butelli, E., Licciardello, C., Zhang, Y., Liu, J., Mackay, S., Bailey, P., Reforgiato-Recupero, G., Martin, C., 2012. Retrotransposons Control Fruit-Specific, Cold-Dependent Accumulation of Anthocyanins in Blood Oranges. *The Plant Cell*, 24(3): 1242-1255.
- Carvalho, S. D., Schwieterman, M. L., Abrahan, C. E., Colquhoun, T. A., & Folta, K. M., 2016. Light Quality Dependent Changes in Morphology, Antioxidant Capacity, and Volatile Production in Sweet Basil (*Ocimum basilicum*). *Frontiers in plant science*, 7.
- Castillo, J., Obdulio, B., Rio, J.A., 1991. Naringin and Neohesperidin Levels During Development of Leaves, Flower Buds, and Fruits of *Citrus aurantium*. *Plant Physiology*, 99: 67-73.
- Chaudhry, N. A., Maken, M. N., & Ahmad, M. S., 2004. Native Home Historical Background Importance of Citrus Fruit in Pakistan. In *Proc. Int. Conf Citric*, 28-30.
- Concha, J., Soto, C., Chamy, R., Zuniga, M.E., 2004. Enzymatic Pretreatment on Rose-Hip Oil Extraction: Hydrolysis and Pressing Conditions. *Journal of American Oil Chemist's Society*, 81 (6): 549–552.
- Dagla, H. R., 2012. Plant Tissue Culture. *Resonance-Heidelberg*, 17(8): 759.
- Davis, W. B., 1947. Determination of Flavanones in Citrus Fruits. *Anal. Chem.*, 19: 476-478.
- De-Eknamkul, D., Ellis, B.E., 1985. Effects of Macronutrients of Growth and Rosmarine Acid Formation in Cell Suspension Cultures of *Anchusa officinalis*. *Plant Cell Rep.*, 4: 46-49.

- Fang, Z. Z., Zhou, D. R., Ye, X. F., Jiang, C. C., & Pan, S. L., 2016. Identification of Candidate Anthocyanin-Related Genes by Transcriptomic Analysis of 'Furongli' Plum (*Prunus salicina* Lindl.) During Fruit Ripening Using RNA-Seq. *Frontiers in plant science*, 7.
- FAO., 2017. <http://www.fao.org/faostat/en/#data> (Erişim: 03.01.2018).
- Farzami, M.S., Ghorbani, M., 2005. Formation of Catechin in Callus Cultures and Micropropagation of *Rheum ribes* L. *Pak. J. Biol. Sci.*, 8: 1346-1350.
- Ferhat, M. A., Boukhatem, M. N., Hazzit, M., Meklati, B. Y., & Chemat, F., 2016. Cold Pressing Hydrodistillation and Microwave Dry Distillation of Citrus Essential Oil from Algeria: A Comparative Study. *Electronic Journal of Biology*.
- Fisher, J. F., Wheaton, T. A., 1976. A high-Pressure Liquid Chromatographic Method for the Resolution and Quantitation of Naringin and Naringenin Rutinoid in Grapefruit Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24(4): 898-899.
- Gao, L. W., Jiang, D. H., Yang, Y. X., Li, Y. X., Sun, G. S., Ma, Z. H., & Zhang, C. W., 2016. De Novo Sequencing and Comparative Analysis of Two Phalaenopsis Orchid Tissue-Specific Transcriptomes. *Russian journal of plant physiology*, 63(3): 391-400.
- Gmitter, F. G., 1995. Origin, Evolution and Breeding of the Grapefruit. *Plant Breeding Reviews*, 13: 345-363.
- Goleniowski, M., Tirppi, V.S., 1999. Effect of Growth Medium Composition on Psilostachyinolides and Altamisin Production. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 56: 215-218.
- Gopi, C., Vatsala, T.M., 2006. In Vitro Studies on Effects of Plant Growth Regulators on Callus and Suspension Culture Biomass Yield from *Gymnema sylvestre* R.Br. *Afr. J. Biotechnol.*, 5: 1215-1219.

- Gorinstein, S., Huang, D., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Yamamoto, K., Soliva-Fortuny, R., Martin Belloso, O., Martinez Ayala, A. L., and Trakhtenberg, S., 2006. Determination of Naringin and Hesperidin in Citrus Fruit by High-Performance Liquid Chromatography. The Antioxidant Potential of Citrus Fruit, *Acta Chromatographica*, 17.
- Green, C. O., Wheatley, A.O., Osagie, A.U., Morrison, E. Y. ST. A., Asemota, H.N., 2007. Determination of Polymethoxylated Flavones in Peels of Selected Jamaican and Mexican Citrus (*Citrus* spp.) Cultivars by High Performance Liquid Chromatography. *Biomedical Chromatography*, 21(1): 48-54.
- Gursoy, N., Tepe, B., Sokmen, M., 2010. Evaluation of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Peel Oil of *Citrus nobilis*. *International Journal of Food Properties*, Volume 13, 5: 983-991.
- Hanmoungjai, P., Pyle, D.L., Niranjan, K., 2001. Enzymatic Process for Extracting Oil and Protein from Rice Bran. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 78 (8): 817–821.
- Hannay, J.B., Hogarth, J., 1879. On the Solubility of Solid in Gases. *Proceeding of the Royal Society of London*, 29: 324–326.
- Hensz, R. A., 1971. 'Star Ruby', A New Deep-Red-Fleshed Grapefruit Variety with Distinct Tree Characteristics. *J. Rio Grande Valley Hort. Soc*, 25: 54-58.
- Hensz, R. A., 1977. Mutation Breeding and the Development of the 'Star Ruby' Grapefruit. *Proc. Int. Soc. Citriculture* , 2: 582-585.
- Hodgson, R.W. 1967. Horticultural varieties of citrus. In: Reuther W., Webber H.J., Batchelor, L.D. (eds). *The citrus industry*. University of California Press, Berkeley, 431-591.
- Hosni, K., Zahed, N., Chrif, R., Abid, I., Medfei, W., Kallel, M., Ben Brahim, N., Sebei, H., 2010. Composition of Peel Essential Oils from Four Selected Tunisian Citrus Species: Evidence for the Genotypic Influence. *Food Chem.*, 123: 1098–1104.

- Iwasa, K., Takao, N., 1982. Formation of Alkaloids in *Corydalis ophiocarpa* Callus Cultures. *Phytochem.*, 21: 611-614.
- Jeyakani Santhosh, M., and Rajalakshmi, M., 2016. Total Polyphenol Content Present in Tissue Culture of *Melaleuca alternifolia*, *WJPPS*, 5(9): 1163-1169.
- Ji, X. H., Zhang, R., Wang, N., Yang, L., & Chen, X. S., 2015. Transcriptome Profiling Reveals Auxin Suppressed Anthocyanin Biosynthesis in Red-Fleshed Apple Callus (*Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 123(2): 389-404.
- Kafa, G., and Canıhoş, E., 2010. Turunçgil Yetiştiriciliği. *YAYÇEP*, yayın no: 54.
- Kamal, G. M., Anwar, F., Hussain, A. I., Sarri, N., & Ashraf, M. Y., 2011. Yield and Chemical Composition of Citrus Essential Oils as Affected by Drying Pretreatment of Peels. *International Food Research Journal*, 18(4): 1275-1282.
- Kamal, G. M., Ashraf, M. Y., Hussain, A. I., Shahzadi, A., & Chughtai, M. I., 2013. Antioxidant Potential of Peel Essential Oils of Three Pakistani Citrus Species: *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis* and *Citrus paradisi*. *Pak. J. Bot.*, 45(4): 1449-1454.
- Kato, M., Ikoma, Y., Matsumoto, H, Sugiura, M., Hyodo, H., and Yano, M., 2004. Accumulation of Carotenoids and Expression of Carotenoid Biosynthetic Genes During Maturation in Citrus Fruit. *Plant Physiol.*, 134: 824-837.
- Kramut, P., & Te-Chato, S., 2010. Effect of Culture Media, Plant Growth Regulators and Carbon Sources on Establishment of Somatic Embryo in Suspension Culture of Oil Palm. *Journal of Agricultural Technology*, 6(1): 159-170.
- Kriaa, D., 2013. Secondary Metabolites Production from Liquid Tissue Culture of *Citrus aurantium*. PhD Thesis, University of Sassari, Italy.

- Latif, S., Anwar, F., 2009. Physicochemical Studies of Hemp (*Cannabis sativa*) Seed Oil Using Enzyme-assisted Cold-Pressing. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111 (10): 1042–1048.
- Lee, H. S., Carter, R. D., Barros, S. M., Dezman, D. J., & Castle, W. S., 1990. Chemical Characterization by Liquid Chromatography of Moro Blood Orange Juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 3(1): 9-19.
- Liang, M., Yang, X., Li, H., Su, S., Yi, H., Chai, L., & Deng, X., 2015. De novo Transcriptome Assembly of Pummelo and Molecular Marker Development. *PloS one*, 10(3): e0120615.
- Lim, T. K., 2012. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*. New York, NY, USA: Springer, 1: 656-687.
- Lin, Q., Wang, C., Dong, W., Jiang, Q., Wang, D., Li, S., Chen, M., Liu, C., Sun, C., & Chen, K., 2015. Transcriptome and Metabolome Analyses of Sugar and Organic Acid Metabolism in Ponkan (*Citrus reticulata*) Fruit During Fruit Maturation. *Gene*, 554(1), 64-74.
- Liu, G., Li, W., Zheng, P., Xu, T., Chen, L., Liu, D., Hussain, S., Teng, Y., 2012. Transcriptomic Analysis of ‘Suli’ pear (*Pyrus pyrifolia* white pear group) Buds During the Dormancy by RNA-Seq. *BMC genomics*, 13(1):700.
- Loke, K. K., Rahnamaie-Tajadod, R., Yeoh, C. C., Goh, H. H., Mohamed-Hussein, Z. A., Zainal, Z., Ismail, I., Noor, N. M., 2017. Transcriptome Analysis of *Polygonum Minus* Reveals Candidate Genes Involved in Important Secondary Metabolic Pathways of Phenylpropanoids and flavonoids. *Peer J*, 5: 2938.
- Lota, M., Serra, D.R., Tomi, F., Casanova, J., 2001. Chemical Variability of Peel and Leaf Essential Oils of 15 Species of Mandarins. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29: 77-104.
- Luque de Castro, M.D., Garcia-Ayuso, L.E., 1998. Soxhlet Extraction of Solid Materials: An Outdated Technique with A Promising Innovative Future. *Analytica Chimica Acta*, 369 (1–2): 1–10.

- Malpathak, N.P., David, S.B., 1986. Flavor Formation in Tissue Cultures of Garlic (*Allium sativum* L.). Plant Cell Rep., 5: 446-447.
- Manaila, E., Berechet, M. D., Stelescu, M. D., Craciun, G., Mihaiescu, D. E., Purcareanu, B., & Radu, M., 2016. Comparation Between Chemical Compositions of Some Essential Oils Obtained by Hydrodistillation from Citrus Peels. Revista de Chimie, 67(1): 106-112.
- Mandalari, G., Bennett, R.N., Bisignano, G., Trombetta, D., Saija, A., Faulds, C.B., Gasson, M.J. ve Narbad, A., 2007. Antimicrobial Activity of Flavonoids Extracted from Bergamot (*Citrus bergamia* Risso) Peel, A Byproduct of the Essential Oil Industry. Journal of Applied Microbiology, 103(6): 2056-2064.
- Martínez-Juárez, V.M., Ochoa-Alejo, N., Lozoya-Gloria, E., Villareal-Ortega, M.L., Ariza-Castolo, A., Esparza-García, F.J. & Calva-Calva, G., 2004. Specific Synthesis of 5:5-Dicapsaicin by Cell Suspensión Cultures of *Capsicum annuum* L. var. annuum (Chile jalapeño chigol) and Their Soluble and NaCl-Extracted Cell Wall Protein Fractions. J. Agric. Food Chem., 52: 972–979.
- Maxam, A.M., Gilbert, W., 1977. A New Method of Sequencing DNA. PNAS, 74: 560-564.
- Mirjalili, M.H., Moyano, E., Bonfill, M., Cusido, R.M., Palazon, J., 2009. Steroidal Lactones from *Withania somnifera*, an Antioxidant Plant for Novel Medicine. Molecules, 14: 2373-2393.
- Mizelle, J. W., Dunlap, W. J., Hagen, R. E., Wender, S. H., Lime, B. J., Albach, R. F., & Griffiths, F. P., 1965. Isolation and Identification of Some Flavanone Rutinosides of the Grapefruit. Analytical Biochemistry, 12(2): 316-324.
- Moriguchi, T., Kita, M., Ogawa, K., Tomono, Y., Endo, T., & Omura, M., 2002. Flavonol Synthase Gene Expression During Citrus Fruit Development. Physiologia plantarum, 114(2): 251-258.

- Mouly, P. P., Gaydou, E. M., Faure, R., & Estienne, J. M., 1997. Blood Orange Juice Authentication Using Cinnamic Acid Derivatives. Variety Differentiations Associated with Flavanone Glycoside Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(2): 373-377.
- Mu, H. Z., Liu, Z. J., Lin, L., Li, H. Y., Jiang, J., & Liu, G. F., 2012. Transcriptomic Analysis of Phenotypic Changes in Birch (*Betula platyphylla*) Autotetraploids. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(10), 13012-13029.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- Murashige, T., Tucker, D.P.H., 1969. Growth Factor Requirements of Citrus Tissue Culture. *Proc. Int. Soc. Citricult.*, 1: 1155-1161.
- Mutz, K.O., Heilkenbrinker A., Lönne, M., Walter, J.G., Stahl F., 2013. Transcriptome Analysis Using Next-Generation Sequencing, *Curr Opin Biotechnol.*, 24(1): 22-30.
- Novaes, E., Drost, D.R., Farmerie, W.G., Pappas, G.J., Grattapaglia, D., Sederoff, R.R., Kirst M., 2008. High-throughput gene and SNP Discovery in *Eucalyptus grandis*, an Uncharacterized Genome. *BMC Genomics*, 9: 312.
- Olivira, A.J.B., Koika, L., Reis, F.A.M., Shepherd, S.L., 2001. Callus Culture of *Aspidosperma ramiflorum* Muell.-Arg. Growth and Alkaloid Production. *Acta Scientia*, 23: 609-612.
- Ollitrault, P., Terol, J., Chen, C., Federici, C. T., Lotfy, S., Hippolyte, I., Ollitrault F., Bérard, A.C., Cuenca, J., Costantino, G., Kacar, Y., Mu, L., Garcia-Lor, A., Froelicher, Y., Aleza, P., Boland, A., Billot, C., Navarro, L., Luro, F., Roose, M.L., Gmitter, F.G., Talon, M., Brunel, D., 2012. A reference genetic map of *C. clementina* hort. ex Tan.; citrus evolution inferences from comparative mapping. *BMC genomics*, 13(1): 593.

- Pare, J.J.R., Belanger, J.M.R., Stafford, S.S., 1994. Microwave-assisted Process (MAP™): a New Tool for the Analytical Laboratory. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 13 (4): 176–184.
- Pasqua, G. Pinarosa, A., Monacelli, B., Santamaria, A. R., Argenti, M. P., 2003. Metabolites in Cell Suspension Cultures, Calli, and in Vitro Regenerated Organs of *Hypericum perforatum* cv. Topas. *Plant Science*, 165: 977-982.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S., & Chemat, F., 2014. An Improved Ultrasound Clevenger for Extraction of Essential oils. *Food Analytical Methods*, 7(1): 9-12.
- Popescu A. N, V. S. Isac, M. S. Coman and M. S. Radulescu., 1997. Somaclonal Variation in Plants Regenerated by Organogenesis from Callus Culture of Strawberry (*Fragaria×ananassa*). *Acta Horticulture*, 439: 89-96.
- Qu, J.G., Yu, X.J., Zhang, W., Jin, M.F., 2006. Significant Improved Anthocyanins Biosynthesis in Suspension Cultures of *Vitis vinifera* by Process Intensification. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 22: 299-305.
- Quail, M.A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T.D., Harris, S.R., Connor, T.R., Bertoni, A., Swerdlow, H.P., Gu, Y., 2012. A Tale of Three Next Generation Sequencing Platforms: Comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina Miseq Sequencers, *BMC Genomics*, 13(1): 341.
- Raeissi, S., Peters, C.J., 2005. Liquid-Vapor and Liquid-Liquid-Vapor Equilibria in the Ternary System Ethane+Limonene+Linalool. *Journal of Supercritical Fluids*, 33: 201-208.
- Ram, M., Prasad, K. V., Singh, S. K., Hada, B. S., Kumar, S., 2013. Influence of Salicylic Acid and Methyl Jasmonate Elicitation on Anthocyanin Production in Callus Cultures of *Rosa hybrida* L. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 113 (3): 459–467.

- Rama, Rao, B., Vijay Kumar, D., Amrutha, R.N., Jalaja, N., Vaidyanath, K., Maruthi, A., Rao, S., Polarrupu, R., Kavi Kishor, P.B., 2008. Effect of Growth Regulators, Carbon Source and Cell Aggregate Size on Berberine Production from Cell Cultures of *Tinospora cordifolia* Miers. Curr. Trends in Biotechnol. Pharmacy, 2: 269-276.
- Rayle D.L., Ross C.W., and Robinson, N., 1982. Estimation of Osmotic Parameters Accompanying Zeatin-Induced Growth of Detached Cucumber Cotyledons. Plant Physiol, 70: 1634-1636.
- Remini, H., Mertz, C., Belbahi, A., Achir, N., Dornier, M., & Madani, K., 2015. Degradation Kinetic Modelling of Ascorbic Acid and Colour Intensity in Pasteurised Blood Orange Juice During Storage. Food chemistry, 173, 665-673.
- Rosenthal, A., Pyle, D.L., Niranjana, K., 1996. Aqueous and Enzymatic Processes for Edible Oil Extraction. Enzyme Microbial Technology, 19 (6): 402-420.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. PNAS, 74: 5463- 5467.
- Sarıman, M., 2013. Multiple Myeloma Hastalarının Kemik İliği Myeloma Hücrelerinde Gen İfadesinin Transkriptom Dizileme Yöntemi ile Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi ,Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Sharma, A., Khare, S.K., Gupta, M.N., 2002. Enzyme-Assisted Aqueous Extraction of Peanut Oil. Journal of American Oil Chemist's Society, 79 (3): 215-218.
- Shaw, P. E., Calkins, C. O., McDonald, R. E., Greany, P. D., Webb, J. C., Nisperos-Carriedo, M. O., & Barros, S. M., 1991. Changes in Limonin and Naringin Levels in Grapefruit Albedo with Maturity and the Effects of Gibberellic Acid on These Changes. Phytochemistry, 30(10): 3215-3219.

- Sihvonen, M., Jarvenpaa, E., Hietaniemi, V., Huopalahti, R., 1999. Advances in Supercritical Carbon Dioxide Technologies. Trends in Food Science and Technology, 10 (6-7): 217-222.
- Şimşek, Ö., 2016. Turunçgillerde Nüseller Embriyoni Mekanizmasında Etkin Olan Genlerin Moleküler Yöntemler ile Araştırılması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Singh, R.K., Sarker, B.C., Kumbhar, B.K., Agrawal, Y.C., Kulshreshtha, M.K., 1999. Response Surface Analysis of Enzyme-Assisted Oil Extraction Factors for Sesame, Groundnut, and Sunflower Seeds. Journal of Food Science and Technology, 36 (6): 511-514.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A., 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdicphosphotungstic Acid Reagents, American Journal of Enology Viticulture, 16: 144-158.
- Skrzypek, Z., Wysokinski, H., 2003. Sterols and Triterpenes in Cell Cultures of *Hyssopus officinalis* L. Ver Lag der Zeitschrift fur Naturforschung, 58(5-6): 308-312.
- Soxhlet, F., 1879. Die Gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. Dingler's Polytechnisches Journal, 232: 461-465.
- Staniszewska, I., Krolicka, A., Mali, E., Ojkowska, E., Szafranek, J., 2003. Elicitation of Secondary Metabolites in in Vitro Cultures of *Ammi majus* L. Enzyme Microbiol. Technol., 33: 565-568.
- Tallevi, S.G., Dicosmo, F., 1998. Stimulation of Indole Alkaloid Content in Vanadium Treated *Catharanthus roseus* Suspension Cultures. Planta Med., 54: 149-152.
- Tatum, J. H., & Berry, R. E., 1973. Method for Determining Naringin Content in Grapefruit Juice. Journal of Food Science, 38(2): 340-341.
- Tüik. 2017. <http://www.tuik.gov.tr/Start.do> (Erişim: 24.07.2017)
- Ustek, D., Abacı N., Sırma, S., Cakiris, A., 2011. Derleme: Yeni Nesil DNA Dizileme İ.Ü. DETAE Dergisi, (1): 11-18.

- Vankar, P.S., 2004. Essential Oils and Fragrances from Natural Sources. *Resonance*, 9 (4): 30–41.
- Vekiari, S. A., Protopapadakis, E. E., Papadopoulou, P., Papanicolaou, D., Panou, C., & Vamvakias, M., 2002. Composition and Seasonal Variation of the Essential Oil from Leaves and Peel of a Cretan Lemon Variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1): 147-153.
- Wagner, C. J., Wilson, C. W., & Shaw, P. E., 1988. Reduction of Grapefruit Bitter Components in a Fluidized β -Cyclodextrin Polymer Bed. *Journal of Food Science*, 53(2): 516-518.
- Wang, J., Qian, J., Yao, L., & Lu, Y., 2015. Enhanced Production of Flavonoids by Methyl Jasmonate Elicitation in Cell Suspension Culture of *Hypericum perforatum*. *Bioresources and Bioprocessing*, 2(1): 5.
- Wang, R., Xu, S., Wang, N., Xia, B., Jiang, Y., & Wang, R., 2016. Transcriptome Analysis of Secondary Metabolism Pathway, Transcription Factors and Transporters in Response to Methyl Jasmonate in *Lycoris aurea*. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M., 2009. RNA-Seq: A Revolutionary Tool for Transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1): 57-63.
- Weber, A. P., Weber K. L., Carr, K., Wilkerson, C., Ohlrogge, J. B., 2007. Sampling the Arabidopsis Transcriptome with Massively Parallel Pyrosequencing *Plant Physiology*, 144: 32-42.
- Wee, S. L., Yap, W. S. P., Alderson, P. G., & Khoo, T. J., 2013. Effects of Elicitors on in Vitro Cultures of *Sauropus androgynous* (Sweet Shoot) for Sustainable Metabolite Production and Antioxidant Capacity Improvement. In VIII International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, 1083: 145-155.

- Wu, J., Xu, Z., Zhang, Y., Chai, L., Yi, H., and Deng, X., 2014. An Integrative Analysis of the Transcriptome and Proteome of the Pulp of a Aspontaneous Late-Ripening Sweet Orange Mutant and Its Wild Type Improves Our Understanding of Fruit Ripening in Citrus. *Journal of Experimental Botany*, 65(6): 1651-1671.
- Xu, J. and Deng, X. X., 2002. Identification of Main Pigment in Cara Cara Navel Orange (*Citrus sinensis* L.) and Evaluation of Their Concentration Changes During Fruit Development and Storage (in Chinese). *Acta Hort Sin.*, 29: 203-208.
- Young, M. D., Wakefield, M. J., Smyth, G. K., & Oshlack, A., 2010. Gene Ontology Analysis for RNA-seq: Accounting for Selection Bias. *Genome Biology*, 11(2): R14.
- Yu, Q., Plotto, A., Baldwin, E. A., Bai, J., Huang, M., Yu, Y., Dhaliwal H. S., & Gmitter, F. G., 2015. Proteomic and Metabolomic Analyses Provide Insight into Production of Volatile and Non-Volatile Flavor Components in Mandarin Hybrid Fruit. *BMC Plant Biology*, 15(1): 76.
- Yusof, S., Mohd Ghazali, H., Swee King, G., 1990. Naringin Content in Local Citrus Fruits. *Food Chemistry*, 37: 113–121.
- Zarei, A., Zamani, Z., Mousavi, A., Fatahi, R., Alavijeh, M. K., Dehsara, B., & Salami, S. A., 2012. An Effective Protocol for Isolation of High-Quality RNA from Pomegranate Seeds. *Asian Aust J. Plant Sci. Biotechnol.*, 6: 32-7.
- Zenoni, S., Ferrarini, A., Giacomelli, E., Xumerle, L., Fasoli, M., Malerba, G., Bellin, D., Pezzotti, M. & Delledonne, M., 2010. Characterization of Transcriptional Complexity During Berry Development in *Vitis vinifera* Using RNA-Seq. *Plant physiology*, 152(4):1787-1795.
- Zosel, K., 1964. German Patent, 1493: 190.
- Zougagh, M., Valcarcel, M., Rios, A., 2004. Supercritical Fluid Extraction: A Critical Review of Its Analytical Usefulness. *Trends in Analytical Chemistry*, 23 (5): 399–405.

ÖZGEÇMİŞ

Taner BOZKURT, 28.02.1983 tarihinde Adana'da doğdu. İlkokul öğrenimini Ceyhan, orta ve lise öğrenimini ise Adana'da tamamladı. Üniversite öğrenimini 2000 yılında İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde başladı ve 2005 yılında aynı bölümden mezun oldu. 2007 yılında Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı ve 2009 yılında tamamladı. Doktora öğrenimine 2011 yılında Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Bölümü'nde başladı. Tübitak-Teydeb projesi ile 2013 yılında Çukurova Üniversitesi, Teknokent içerisinde Bozkurt Biyoteknoloji Ar-Ge Hiz. Ltd. Şti. firmasını kurdu ve halen aynı firmada Genel Müdür olarak Ar-Ge çalışmalarına devam etmektedir.



EKLER



EK 1. Çalışmalarda kullanılan turuncgil çeşitlerine ait uçucu yağların sahip olduğu kimyasal bileşimler

	Satsuma mandarini	Klemantin Mandarini	Meyer Limonu	Interdonat Limonu	Washington Navel Portakal	Moro Kan Portakal	Star Ruby Altıntop	Turunc
α -thujene	0,21		0,60	0,43				
α -pinene	1,29	0,45	1,93	2,04	0,91	0,90	0,92	0,80
Sabinene	0,22	0,55	0,32	1,57	0,92	0,79	2,39	0,26
β -pinene	0,45	0,04	1,06	9,51	0,04	0,05	0,26	0,81
β -Myrcene	2,30	3,09	2,24	1,68	2,63	2,46	2,23	2,39
Octanal		0,54			0,55	0,11	0,55	0,21
3-carene		0,06			0,51	0,18		
m-cymene	5,14		5,37	7,29			0,15	
d-limonene	86,33	90,88	75,50	66,58	92,01	93,32	89,82	89,30
eucalyptol			0,47					
β -cis-ocimene		0,05					0,17	0,28
tetra terpinene	1,19	0,06	5,94	4,24				
n-octanol		0,08			0,11			
(+)-4-carene				0,20				
Terpinolene		0,90	0,48		0,10			
α , p-dimethyl styrene			0,34					
Linalool	0,16	0,06	0,41	0,22	0,45	0,69	0,25	3,43
nonanal					0,08			
cis-limonene oxide	0,47	0,08						
trans-limonene oxide	0,67	0,15		0,22		0,10		
β -citronellal		0,12	0,13		0,09			
4-terpineol	0,10	0,21	0,14	0,27	0,09	0,05	0,25	
α -terpineol	0,15		0,33	0,39	0,14	0,10	0,18	0,35
teresantalol			0,40					
n-decanal		1,09			0,60	0,13	0,30	0,17
cis-carveol						0,07		
trans-carveol						0,07		
o-methylthymol			0,17					
Bergamiol (linalool acetate)								1,28

thymol			2,56					
cis-citral				0,87	0,08			
trans-citral				1,17	0,10			
perillal		0,14						
trans-p-mentha-2,8-dienol						0,09	0,13	
cis-p-mentha-2,8-dienol						0,13	0,17	
4-isopropenyl-1-methyl-1,2-cyclohexanediol				0,32		0,04	0,22	
Nerol acetate				0,69			0,10	0,08
teta muurolene					0,03	0,14		
α -copaene		0,12					0,19	
cis-geraniol							0,16	
Geraniol acetate				0,31				0,20
β -cubebene		0,11					0,14	0,12
n-dodecanal		0,23			0,09			0,05
Germacrene D					0,04	0,04		
β -elemene			0,14					
β -caryophyllene			0,12	0,16	0,03		0,27	0,08
α -bergamotene			0,23	0,65				
β -Farnesene		0,09	0,16				0,15	
α -caryophyllene							0,05	
α -humulene			0,09					
β -cubebene			0,19					
(+)-Valencene					0,27	0,17		
β -bisabolene			0,35	0,91				
cadinene		0,16			0,06	0,03	0,17	
$\pm$ trans nerolidol								0,05
Spathulenol				0,13				
caryophyllene oxide				0,16			0,09	
Eudesm-7 (11)-en-4-ol								
β -sinensal						0,02	0,10	
cis-Farnesol								
α -sinensal		0,55						
β -sinensal								
Nootkatone					0,03	0,02	0,34	0,06

EK 2. Örneklere ait genlerin listesi ve FPKM değerleri

Gene ID	Portakal Albedo	Altıntop Albedo	Kallus (Altıntop Albedo)
18047193	7546.37	9756.09	310.13
18054693	3791.42	4346.73	1636.46
18045570	3609.34	4118.26	839.97
18053831	3510.13	7655.16	1334.39
18041230	3468.52	3332.21	909.05
18034913	2873.03	1129.97	1549.28
18032801	2818.56	4732.62	7528.64
18054382	2590.22	4041.62	129.95
18052054	2182.11	687.93	23468
18045786	1917.98	1234.23	87.01
18038476	1868.68	5499.49	0.29
18044426	1855.11	990.18	96.32
18032744	1813.62	1714.15	475.86
18040548	1686.40	388.62	82.72
18034632	1657.54	334.77	155.28
18047405	1595.17	1275.42	861.28
18038981	1584.61	1453.19	2165.25
18035043	1559.37	1108.68	545.49
18038380	1488.04	1517.56	22737
18036300	1483.49	1986.02	719.92
18049178	1392.60	1382.25	128.46
18040705	1364.03	1658.10	129.74
18031578	1355.65	731.15	213.28
18032368	1327.93	88.63	1069.39
18039091	1326.70	2119.00	3888.47
18048227	1324.77	4301.12	42941
18033506	1318.36	433.81	820.35
18049003	1306.32	491.42	73.19
18049151	1279.35	1092.59	1154.11
18037155	1269.30	626.06	610.44
18049864	1207.68	850.34	156.05
18033883	1147.02	599.97	769.37
18032037	1141.16	1320.29	1303.31
18038959	1123.80	1237.82	729.90
18039813	1115.37	956.28	47119
18054819	1115.09	1351.58	896.04
18043550	1066.73	1709.92	838.74
18053445	1030.85	812.40	550.91
18040704	1021.95	215.96	17.21

18033281	987.47	266.07	3335.68
18041660	924.77	457.65	154.81
18035130	919.93	623.24	1038.47
18042192	919.14	1326.07	495.11
18040627	918.83	1195.41	300.30
18034663	915.74	464.44	234.25
18050069	903.48	814.13	204.63
18040745	898.82	483.45	1765.92
18051126	888.55	1282.00	656.01
18033667	867.66	524.52	1310.39
18038263	861.49	4827.02	0.43
18034731	854.64	1472.11	78.30
18032751	847.12	712.10	3318.86
18047913	845.44	977.52	2018.45
18050937	825.56	959.54	90.87
18054952	811.98	1071.00	43072
18048807	811.98	304.72	515.02
18043358	810.14	611.13	861.27
18037947	806.00	944.14	1729.05
18039056	799.62	1556.43	534.84
18039429	796.23	969.22	287.19
18040537	796.07	581.83	932.59
18044530	772.94	708.58	325.88
18035399	759.92	640.76	497.74
18041863	745.63	770.25	519.06
18051155	743.52	715.29	741.02
18045712	726.08	829.24	571.37
18046053	723.28	656.40	455.53
18036164	717.37	160.85	187.84
18046962	714.29	783.33	237.00
18031316	706.51	1457.32	739.83
18054687	703.02	716.63	558.17
18043894	694.48	251.11	26481
18046067	682.00	670.21	593.07
18054682	671.23	854.48	6242.46
18047924	666.34	465.59	148.76
18038454	662.91	1768.21	689.32
18042892	662.64	1200.70	81.64
18044014	650.20	618.87	759.43
18055370	641.49	391.72	370.64
18045180	637.88	1018.82	144.14
18044876	637.23	401.60	864.36
18050645	635.80	357.44	362.26

18032390	632.43	440.11	338.60
18031626	618.16	982.77	2129.65
18051012	617.83	567.06	535.92
18049179	617.74	375.75	38.88
18041968	617.15	3005.19	424.75
18032372	616.43	290.89	11871
18055490	614.64	577.79	558.45
18044960	611.73	358.60	785.50
18040008	611.41	656.38	2547.90
18051258	609.33	551.37	83.21
18038227	604.61	321.69	76.59
18039977	603.26	627.34	1232.46
18039106	585.93	820.60	395.03
18048768	584.31	344.01	187.36
18051413	582.41	395.25	563.91
18047657	581.27	410.47	817.63
18038444	577.50	839.05	669.79
18049928	556.95	529.48	954.60
18052333	549.82	155.63	447.80
18040827	547.79	757.56	302.03
18055701	545.67	576.85	275.92
18046846	540.42	305.49	314.20
18036870	536.42	108.19	387.95
18051471	536.28	245.46	67.61
18036949	534.32	589.05	335.37
18045297	531.98	556.63	756.73
18032530	529.15	419.16	416.73
18039579	528.18	1013.81	86.42
18047520	526.67	772.69	390.52
18032580	523.17	485.50	612.89
18044252	521.64	670.39	360.49
18034808	518.98	778.68	210.23
18052371	516.98	192.24	229.12
18045977	516.70	731.89	83.88
18049957	506.08	341.72	942.80
18034322	505.72	155.90	1543.91
18040699	505.41	475.12	50.67
18035451	503.31	111.30	627.56
18043062	502.68	388.91	361.99
18049579	499.48	0	0.16
18037475	494.41	158.56	587.89
18050878	493.82	456.20	432.58
18050952	491.26	464.37	142.43

18046477	489.96	245.57	1165.23
18053472	487.28	237.57	202.64
18044424	487.03	224.66	286.07
18044649	486.08	283.40	466.21
18032152	484.96	363.28	552.50
18053463	480.47	272.58	267.87
18044487	480.02	459.78	297.79
18038086	478.05	439.55	380.57
18033779	477.54	331.33	424.55
18040785	474.22	567.60	593.49
18033097	472.39	358.46	680.08
18043592	469.03	564.92	241.23
18033367	468.47	446.90	205.13
18039717	465.90	601.22	310.94
18035363	465.86	312.47	784.92
18031953	465.44	403.72	672.39
18032785	463.72	238.29	653.21
18039975	460.49	387.32	651.00
18033464	459.18	427.92	372.84
18039360	458.80	292.98	549.44
18044628	458.79	344.31	554.59
18033661	448.21	521.68	402.21
18037444	447.72	381.55	585.70
18039033	447.04	402.89	327.45
18055466	443.82	364.38	424.82
18033735	439.98	440.26	582.58
18045372	434.56	520.59	701.77
18039297	433.40	420.97	401.94
18035261	433.09	410.27	538.85
18054940	431.80	321.67	263.36
18031355	431.79	530.81	42946
18051892	427.52	289.03	572.08
18045478	426.00	405.68	523.23
18048961	425.87	212.86	469.19
18032167	422.00	634.21	103.50
18050981	419.19	518.49	267.10
18035393	417.99	477.37	71.13
18036494	417.05	282.11	575.64
18038885	415.85	371.74	109.24
18039250	415.14	148.34	393.98
18051860	413.33	308.75	158.34
18037934	412.63	234.95	16.20
18051089	412.11	291.57	334.42

18041206	411.09	17958	13210
18034822	410.60	613.37	1283.97
18048635	408.23	543.69	34547
18050758	407.85	234.73	77.62
18038675	401.71	284.71	474.83
18052558	401.19	750.78	93.10
18051570	400.63	638.60	89.54
18042543	399.63	228.51	176.96
18050996	399.24	552.20	214.23
18041847	398.47	257.14	643.33
18039364	398.38	196.49	36.43
18040987	396.28	389.95	14946
18034960	395.83	297.51	425.05
18044675	395.26	616.29	63.88
18033924	394.62	350.02	397.78
18044470	394.51	311.36	380.90
18032732	393.46	204.80	142.50
18056163	393.40	431.64	489.01
18033002	392.69	467.46	386.15
18035848	391.50	82.64	29.26
18044969	389.58	328.28	542.44
18047056	389.42	205.00	241.33
18053659	389.23	198.96	173.94
18034679	387.31	430.37	176.31
18053772	386.63	294.99	753.77
18038771	385.39	283.49	416.78
18047132	385.33	486.84	452.84
18044726	384.53	209.26	219.43
18052999	382.52	361.85	415.38
18039774	382.45	350.16	298.45
18039953	381.16	382.59	537.03
18038848	380.15	301.67	135.95
18055269	379.41	204.08	691.69
18052927	379.34	438.61	379.44
18034834	378.52	46.73	25.26
18042594	378.12	505.84	763.91
18037689	377.93	251.22	280.98
18055221	377.13	218.05	42821
18037082	375.78	244.80	595.46
18043943	373.25	309.46	102.55
18040373	372.78	398.59	189.07
18036932	371.29	453.09	216.48
18045905	369.93	290.05	494.74

18046475	365.30	19.24	16193
18043954	364.68	324.17	42783
18045517	363.71	270.85	476.20
18039933	363.20	344.26	294.82
18041273	361.02	698.69	423.53
18031254	360.77	240.01	953.19
18055287	360.23	124.34	43.40
18043450	359.92	176.61	402.96
18052272	359.70	300.13	1216.12
18039037	357.43	238.91	376.84
18042141	357.40	342.58	46.49
18041044	357.33	109.64	103.22
18031486	356.99	1599.54	4199.57
18039643	354.76	998.10	14.68
18031335	352.39	490.78	311.08
18054917	350.78	658.60	39.65
18055378	350.18	219.61	244.79
18041175	349.67	30529	15.81
18045632	348.99	352.22	240.43
18046368	348.73	189.86	45047
18039386	347.07	348.83	456.17
18052331	343.42	298.41	224.87
18037526	343.23	245.14	321.79
18044146	341.88	306.24	209.01
18041825	341.64	248.42	432.94
18054531	339.04	912.07	43101
18037474	338.34	491.48	441.44
18043743	338.26	267.28	36.12
18038188	336.77	254.64	111.57
18042671	335.30	314.34	198.45
18041624	334.73	416.04	63.39
18035530	333.20	142.92	147.50
18039036	332.25	193.97	536.77
18047760	331.78	307.75	199.26
18042975	331.16	218.62	319.27
18039172	329.40	181.17	328.40
18055413	329.30	505.42	310.14
18038258	328.24	397.77	189.53
18040092	325.62	284.20	20.61
18048971	323.97	179.08	278.58
18031469	323.74	306.12	245.89
18038181	323.23	249.92	263.12
18050455	322.49	311.32	290.56

18039623	321.46	906.84	74.88
18038986	320.12	353.24	176.64
18055968	319.88	354.25	189.19
18036846	319.62	219.71	385.87
18054830	317.15	331.00	363.18
18038960	316.50	290.37	203.15
18043271	316.39	217.59	381.70
18051367	316.08	385.02	1055.40
18050995	315.90	222.39	19876
18040645	315.65	120.28	894.91
18038866	314.36	33573	41.17
18042542	312.97	401.77	310.90
18033964	312.81	437.45	262.71
18035102	312.33	236.24	176.85
18053992	311.37	213.25	419.21
18046934	310.48	292.01	211.88
18038587	310.24	184.30	268.49
18035120	309.55	188.80	189.06
18034047	308.89	216.52	290.60
18054221	306.10	386.75	124.47
18050318	305.95	197.45	233.48
18032147	305.65	228.19	199.15
18037566	304.87	221.29	340.90
18033807	304.54	177.09	221.32
18032116	304.25	142.07	244.04
18038370	303.59	240.12	16346
18033809	302.93	17685	531.38
18044679	302.30	296.22	1318.67
18035014	302.24	154.13	53.57
18043445	301.99	265.62	148.20
18031573	300.49	179.11	210.18
18039871	300.12	239.68	349.55
18047697	299.04	445.35	986.63
18040383	299.00	249.01	32782
18043480	298.40	290.27	244.54
18054641	297.23	346.60	43068
18038162	297.04	283.17	753.44
18042620	295.84	196.53	334.54
18035222	295.80	204.30	101.69
18048547	295.72	294.10	123.16
18042012	295.58	316.67	147.56
18043189	294.27	297.73	165.42
18048968	293.69	234.88	125.34

18039190	293.11	222.62	226.97
18048135	292.87	160.08	250.78
18036438	291.65	211.44	42946
18049113	291.57	234.73	287.99
18055372	291.20	285.45	323.48
18035436	290.93	484.77	158.60
18042662	290.52	387.84	130.96
18039268	290.02	117.96	175.10
18050425	289.60	184.83	232.97
18038506	289.35	271.57	182.17
18041740	288.61	395.86	326.95
18034796	286.17	47.85	0.46
18039792	286.07	188.71	312.16
18048092	285.22	319.60	393.79
18036267	284.75	87.22	369.86
18051349	284.32	109.96	128.07
18043149	283.07	438.89	279.51
18049275	282.75	165.07	145.13
18036436	281.66	379.64	163.20
18035881	281.60	165.54	139.07
18051559	281.40	164.78	260.09
18050711	280.77	203.48	284.36
18032461	279.61	778.83	29.28
18052224	279.47	379.33	81.41
18049070	279.07	182.78	300.99
18037058	279.00	221.60	231.52
18043481	278.99	127.68	20455
18046443	278.71	190.59	450.89
18033078	278.45	182.96	194.01
18041274	278.34	189.04	277.98
18055171	277.73	260.01	820.52
18035870	277.02	111.26	272.12
18042022	275.43	197.40	686.23
18039766	274.65	230.04	122.36
18045793	274.24	122.91	108.72
18041268	273.52	170.14	183.02
18045112	272.85	269.31	293.93
18045333	272.09	348.33	19.44
18055435	270.53	145.42	184.67
18055017	269.59	325.04	50.76
18050479	267.67	315.45	103.96
18048026	267.65	184.82	292.57
18047371	267.43	135.54	210.10

18045163	266.52	256.60	211.48
18055665	266.26	163.52	372.75
18033668	266.17	314.37	346.44
18040369	265.81	774.89	568.73
18048770	265.28	137.54	70.60
18044076	264.99	524.41	134.24
18051998	264.78	269.87	191.85
18047053	264.58	346.14	42.28
18037394	264.52	183.38	205.63
18040006	264.25	279.50	376.45
18037755	264.11	252.36	283.58
18037391	263.92	150.66	295.62
18045695	263.79	230.82	126.23
18045453	261.06	364.63	183.20
18038727	260.92	275.38	386.34
18056146	260.77	209.23	154.07
18042122	260.43	297.87	287.25
18056171	259.82	287.99	266.11
18038292	258.60	236.62	118.03
18036639	258.29	202.40	249.23
18049539	258.19	206.67	230.93
18043962	257.62	158.75	266.06
18037761	257.58	150.64	113.15
18033832	257.38	143.21	219.65
18044893	255.30	103.45	53.03
18037411	255.29	269.69	317.96
18038472	254.73	131.90	174.13
18034337	254.62	112.66	551.33
18054066	253.81	354.75	186.03
18055702	253.08	298.91	154.60
18040485	252.34	1200.05	235.42
18032149	251.97	15585	706.96
18040740	251.86	1087.26	328.67
18049299	251.13	194.59	223.39
18031846	250.87	174.92	214.56
18039816	250.54	238.69	346.45
18051641	249.68	399.45	36.51
18055747	249.58	154.00	207.48
18047216	249.44	99.32	111.21
18038393	249.41	184.43	139.91
18050641	249.07	226.97	43013
18034977	248.70	426.02	47.27
18053802	248.54	218.53	389.54

18045111	247.88	434.89	373.01
18055054	247.49	123.82	82.42
18039385	247.23	215.32	214.81
18039067	246.95	276.31	260.73
18033103	246.32	186.50	417.04
18039879	244.67	341.16	170.60
18039994	244.49	204.08	290.45
18037730	244.29	203.74	234.90
18038148	244.23	222.70	228.78
18038165	242.72	161.71	311.72
18040197	242.16	444.83	333.99
18043344	242.05	204.59	233.40
18045970	241.22	401.25	155.66
18055432	239.80	232.41	100.16
18033519	239.69	302.12	510.13
18036576	239.65	159.11	247.29
18052292	238.94	156.80	100.00
18049324	237.72	308.85	348.17
18046631	237.52	215.17	128.70
18048781	237.38	188.71	214.70
18056136	237.20	150.58	291.38
18055611	237.18	283.79	193.09
18044446	237.16	377.33	672.84
18050001	236.91	290.55	253.57
18051936	236.81	170.12	115.35
18035183	236.77	261.66	258.34
18044141	236.66	322.07	33178
18043132	236.49	167.75	179.49
18044159	236.04	210.09	230.49
18051782	235.82	26.16	0.15
18039610	235.76	213.68	47.28
18052745	235.70	115.54	133.05
18035355	235.55	93.92	76.86
18041178	235.40	339.36	573.84
18044471	235.35	139.03	285.44
18039788	234.50	197.34	306.27
18031340	234.18	298.63	175.05
18031199	232.53	360.27	402.59
18050226	231.56	155.29	266.10
18049277	231.39	391.00	125.28
18055550	231.03	237.39	196.12
18032769	230.50	265.74	44348
18044717	230.03	338.75	489.80

18036864	230.00	159.81	79.35
18047618	229.81	260.56	126.47
18054294	229.59	168.70	178.09
18048974	228.71	321.39	34.91
18037503	228.69	164.52	34.18
18044018	228.53	78.51	105.91
18044271	228.47	867.51	4761.38
18035443	227.60	215.28	74.31
18047342	227.54	230.65	264.22
18041483	226.94	220.33	223.09
18033208	226.28	158.51	62.07
18034483	225.90	187.16	192.61
18035819	225.90	211.95	277.42
18037781	224.87	195.29	139.66
18042942	224.44	247.49	28.18
18035392	224.31	174.53	174.29
18044762	224.11	212.43	2106.65
18043877	224.09	203.02	360.77
18038916	224.07	154.35	108.79
18032758	223.19	367.69	142.04
18032416	223.15	695.31	245.48
18037100	222.49	134.92	245.25
18039598	222.36	184.96	109.69
18039593	222.20	118.13	398.20
18040347	221.24	182.28	294.67
18038470	221.00	280.48	278.39
18053598	220.43	103.38	27.39
18047134	220.13	154.84	186.55
18034173	220.11	205.96	199.41
18044727	219.52	264.07	107.83
18056121	219.49	241.43	139.22
18054594	218.62	187.02	151.48
18039790	218.50	191.81	268.28
18031519	218.29	245.50	443.49
18031351	217.21	256.13	162.59
18050723	216.74	106.09	80.08
18054023	216.50	216.17	43031
18050969	216.01	55.72	31321
18035333	215.69	212.01	607.01
18046234	215.41	182.00	56.98
18033235	215.33	158.31	277.57
18038462	214.66	169.61	192.38
18049386	214.58	179.78	352.96

18054245	214.43	670.62	197.16
18055638	214.08	136.14	281.71
18037901	214.03	160.65	225.72
18041285	213.28	382.16	143.56
18049340	212.97	127.77	256.88
18050704	212.90	160.17	259.06
18038572	212.83	238.31	180.56
18053903	212.83	137.10	196.73
18033733	212.75	21.97	232.57
18055660	212.15	92.32	127.65
18047161	212.06	127.76	15067
18047932	211.93	96.20	537.40
18036337	211.64	279.73	177.97
18035733	211.47	175.40	165.81
18049511	211.16	76.62	34.87
18048110	211.08	138.53	260.80
18033481	211.05	89.83	111.75
18043785	211.02	169.35	138.69
18046265	210.28	206.17	266.36
18035343	210.24	199.45	179.39
18051127	209.88	166.61	228.14
18032402	209.41	67.24	105.69
18043130	209.10	482.54	79.39
18054995	209.10	141.85	234.51
18040145	208.65	172.12	169.65
18049278	208.29	257.29	109.12
18034598	207.88	187.72	148.10
18052823	207.49	190.94	83.53
18046435	207.28	143.31	107.93
18041235	207.11	397.83	102.01
18053396	206.39	234.17	136.58
18039744	206.37	156.80	63.97
18042808	205.65	0	0
18036487	205.63	240.07	98.65
18047133	205.50	34.85	170.27
18042700	205.22	263.10	145.12
18031978	204.65	212.47	177.05
18046349	204.60	138.18	146.54
18033399	204.51	310.01	76.90
18039073	204.46	220.39	10959
18039305	203.46	193.25	117.63
18042031	203.32	157.27	273.96
18043770	203.10	415.92	961.47

18035015	203.10	342.76	130.97
18050389	202.84	203.90	119.16
18043471	202.58	106.38	36.27
18036482	201.83	74.31	0.18
18052521	201.41	138.60	141.41
18047117	201.28	117.83	128.04
18040625	200.70	635.65	134.26
18032701	200.57	160.87	273.70
18045211	200.37	176.52	186.06
18037132	200.16	83.17	166.13
18048141	200.07	155.58	185.48
18047109	199.78	169.60	157.88
18050901	199.34	169.78	319.28
18046224	198.68	187.81	362.27
18043572	198.46	113.20	229.94
18047526	198.23	155.59	235.57
18041678	197.92	165.93	107.93
18045056	197.71	547.15	1.00
18045173	197.70	175.35	168.16
18038754	197.50	181.13	472.39
18044096	197.46	104.66	249.45
18034787	197.04	138.47	157.50
18049773	197.02	109.51	368.14
18050342	197.00	166.09	152.85
18046090	196.98	244.87	134.88
18055371	196.82	220.89	212.97
18050414	196.81	216.06	147.36
18048649	196.80	215.28	118.14
18050357	196.16	204.03	13.58
18055885	196.06	182.31	94.17
18037606	195.59	443.21	1168.40
18034398	195.37	271.09	209.20
18041757	195.22	156.35	130.75
18032434	195.08	192.91	102.73
18050630	195.07	667.46	15.96
18047679	194.99	120.44	200.57
18044195	194.79	214.03	83.62
18050404	194.56	111.27	117.85
18053290	194.50	242.84	216.29
18033113	193.92	126.70	270.91
18037883	193.78	125.49	52.79
18046779	193.54	169.36	158.40
18054942	193.43	217.14	295.48

18050248	193.36	129.96	203.56
18053894	193.12	107.11	210.79
18055765	193.08	148.51	202.61
18038845	192.97	138.12	165.93
18049164	192.95	208.79	141.03
18046567	192.70	172.43	143.87
18053175	192.58	210.64	161.60
18041907	192.30	132.77	109.64
18045323	191.96	153.52	137.68
18051387	191.53	209.79	191.73
18054645	191.42	157.28	435.07
18031882	191.32	128.60	70.36
18031868	190.96	167.77	76.31
18044961	190.07	134.28	325.51
18031763	189.83	151.82	156.75
18041928	189.33	236.42	155.08
18039706	189.25	236.91	99.18
18055362	188.99	299.14	18719
18037438	188.97	247.16	144.99
18047252	188.19	46.04	18295
18049802	188.12	228.63	156.93
18041973	187.85	143.72	129.30
18039362	187.70	142.15	312.04
18037507	187.62	95.01	26.95
18033355	187.50	207.35	289.27
18046083	187.21	159.07	182.24
18031585	186.95	186.43	114.68
18045228	186.88	184.22	159.51
18037682	186.86	155.57	127.30
18039869	186.79	140.19	235.17
18036720	186.58	19299	67.37
18045003	186.02	174.32	134.40
18048576	185.95	135.37	104.86
18048822	185.46	212.41	33.42
18048710	184.65	323.58	261.61
18035148	184.54	182.83	299.58
18037658	184.48	95.29	387.71
18032435	184.41	163.00	164.91
18038283	184.40	167.84	190.55
18049411	183.80	203.87	2808.11
18038101	183.69	158.75	742.24
18039895	183.35	171.42	326.54
18053024	183.25	110.15	75.10

18042866	183.14	110.62	110.34
18033622	183.00	196.65	164.86
18037277	182.05	114.94	245.61
18055395	181.85	122.62	2104.18
18037067	181.79	110.89	369.18
18031532	180.99	66.58	154.10
18036782	180.88	194.27	219.93
18034413	180.15	212.26	96.49
18054352	179.84	170.98	159.72
18048996	179.27	260.37	860.55
18038556	179.20	123.45	142.09
18037913	179.20	124.93	142.11
18048347	179.03	141.12	259.53
18039066	178.91	158.96	241.80
18031691	178.89	134.82	33.46
18034358	178.82	42997	558.34
18048125	178.66	455.94	14.53
18053926	178.59	182.12	169.01
18035894	178.21	134.77	147.75
18034870	178.15	146.55	68.66
18039827	177.95	179.43	247.33
18031343	177.25	190.59	167.17
18031548	176.93	113.89	236.77
18034105	176.69	130.56	143.66
18033557	176.14	123.12	190.96
18041255	175.90	135.08	78.81
18039035	175.88	163.30	333.41
18053289	175.86	86.34	124.47
18047324	174.83	320.72	33.92
18051020	174.15	65.62	0.10
18036909	173.83	126.52	24.87
18036211	173.79	23.55	83.15
18055074	173.49	264.72	354.78
18039215	173.35	150.70	116.83
18033117	173.29	96.30	120.33
18056014	172.78	140.69	113.43
18046668	172.50	285.77	135.24
18036787	172.18	197.42	51.54
18051747	172.07	152.51	179.13
18054004	172.07	84.73	33.18
18043295	171.91	160.00	239.21
18039000	171.68	157.20	215.18
18032085	171.40	137.59	84.92

18048698	171.12	145.51	45.56
18050708	170.74	115.27	217.47
18050991	170.62	130.00	45505
18040949	170.38	150.03	142.92
18039197	169.80	136.43	29768
18040206	169.69	165.63	167.47
18039584	169.68	426.68	204.38
18031668	169.67	82.52	20149
18043141	169.57	577.59	35.50
18034865	168.82	162.50	177.93
18051320	168.35	441.31	524.09
18037995	168.34	213.43	43018
18039177	168.30	562.18	0
18039214	168.16	107.53	75.55
18043308	167.86	153.26	182.80
18034519	167.50	117.35	42905
18055868	167.36	160.34	98.23
18035633	167.23	76.98	455.77
18052866	167.18	295.68	205.33
18036948	167.09	77.58	166.95
18043542	166.95	62.30	22.24
18051877	166.88	92.60	70.95
18049751	166.23	127.88	116.30
18040917	166.20	106.64	237.08
18053612	165.52	88.52	157.50
18034862	165.25	411.49	239.74
18042879	165.22	107.69	124.27
18036044	164.95	145.15	133.59
18038755	164.87	202.09	51.20
18054271	164.74	129.00	89.08
18050597	164.73	105.92	134.66
18045141	164.29	120.29	266.05
18044773	164.14	191.64	98.42
18042810	164.06	101.68	56.84
18053611	163.65	113.46	117.54
18047683	163.46	103.10	74.37
18048855	163.33	151.08	129.45
18053376	163.31	1107.21	522.51
18036530	163.27	101.95	118.16
18047178	163.06	423.22	321.42
18049370	162.95	244.57	119.40
18044197	162.54	162.07	419.28
18056159	162.12	180.37	209.54

18036179	162.01	115.49	146.10
18048273	161.99	72.88	38.20
18048995	161.98	108.17	152.46
18040618	161.64	156.35	74.30
18033471	161.51	116.03	251.75
18032650	161.34	149.34	234.99
18053803	161.25	146.99	102.53
18036876	160.97	26.44	25628
18039709	160.82	103.90	88.47
18034848	160.71	194.17	145.45
18036869	160.21	121.80	127.04
18034875	160.12	113.92	126.19
18044127	159.79	83.45	42851
18039769	159.57	101.80	139.98
18031228	159.48	1101.35	338.89
18054966	159.30	152.26	172.49
18054769	159.27	125.94	280.24
18040450	158.86	99.34	178.58
18034688	158.75	150.13	121.48
18050998	158.56	164.08	94.84
18048449	158.35	178.11	100.31
18039824	158.18	208.51	89.10
18047218	158.00	96.82	104.88
18052746	157.37	112.30	79.52
18047868	157.10	137.42	45.00
18054490	156.95	107.40	227.32
18035409	156.84	42.89	0.58
18049037	156.82	101.74	145.41
18033421	156.77	377.18	39.29
18044543	156.65	226.14	203.30
18054258	156.39	260.02	63.70
18035181	156.31	119.15	149.84
18055274	156.16	86.59	120.83
18034552	156.11	277.62	39.71
18031450	156.09	112.64	101.41
18047684	155.86	30.94	0.56
18049788	155.79	142.20	73.94
18039328	155.74	72.85	23.93
18038879	155.61	319.66	274.26
18046301	155.51	184.27	152.90
18047775	155.33	111.59	16346
18045634	155.23	143.17	156.77
18036416	155.07	180.43	189.54

18049412	154.32	448.47	4538.17
18032745	154.16	106.15	64.22
18052288	154.10	103.29	266.53
18041207	154.01	125.30	88.33
18035136	153.89	115.72	370.72
18045139	153.74	198.93	933.66
18041028	153.48	52.66	39.00
18041769	153.23	137.85	220.95
18035285	153.15	270.56	54.69
18049400	153.12	155.85	59.82
18031223	152.83	101.60	263.61
18052763	152.77	50.35	30.97
18033755	152.63	140.73	175.90
18047013	152.57	57.59	22.37
18039375	152.39	117.81	127.39
18038257	152.22	200.54	215.63
18033033	152.18	119.02	96.98
18051077	151.96	147.99	193.13
18037260	151.91	461.38	152.67
18036743	151.84	94.70	128.57
18055601	151.75	92.96	100.10
18038409	151.69	129.52	226.03
18038191	151.69	356.75	508.72
18040527	151.62	126.32	93.58
18049733	151.58	147.29	0.02
18040260	151.52	76.21	71.12
18035179	151.48	113.69	70.20
18034923	151.37	107.01	51.85
18031857	151.28	137.33	149.68
18042802	151.20	60.79	70.74
18036053	151.19	223.23	121.82
18039191	151.19	187.56	71.27
18050388	151.09	186.24	63.24
18055085	150.96	148.85	102.25
18053853	150.94	74.95	84.37
18038455	150.75	136.01	128.91
18036688	150.52	140.66	245.07
18048560	150.28	140.98	111.62
18037069	149.88	114.07	82.65
18045727	149.28	144.57	0.14
18031328	149.02	108.74	15.76
18048575	148.66	121.90	219.13
18045957	148.42	84.83	35.49

18045888	148.36	89.12	85.96
18056093	148.33	216.74	72.34
18055962	148.29	71.73	81.59
18052379	148.27	143.76	120.03
18050029	148.23	193.31	104.00
18051795	147.89	111.59	109.73
18043053	147.72	122.90	125.00
18033438	147.28	220.65	0
18032004	147.13	190.16	187.97
18031249	146.80	100.24	358.93
18052689	146.62	87.61	83.42
18054028	146.52	182.02	28.61
18053423	146.51	164.50	93.16
18052308	146.48	105.70	13.34
18050006	146.25	12510	0
18034308	146.06	98.29	6117.50
18036461	146.04	136.00	120.08
18040468	146.03	89.46	176.69
18043961	145.92	52.01	34.23
18053805	145.86	231.41	139.54
18037693	145.65	153.94	150.73
18050518	145.31	100.79	105.58
18050490	145.15	86.44	196.45
18034539	145.11	103.99	126.56
18033979	144.94	131.01	107.71
18054977	144.68	64.09	76.27
18045229	144.54	137.65	172.96
18054836	144.16	124.99	115.36
18049206	143.90	122.85	171.70
18046145	143.48	102.39	412.29
18041187	143.19	93.13	234.04
18047387	142.89	47.77	184.48
18056141	142.88	102.83	103.36
18033429	142.61	94.80	128.65
18054192	142.49	132.20	95.95
18036708	142.41	145.83	146.77
18054587	142.26	122.75	173.08
18038363	142.18	159.01	86.23
18043554	141.99	122.39	157.83
18035338	141.97	129.20	281.02
18042438	141.73	83.10	530.04
18031476	141.55	97.69	28.86
18045998	141.34	155.04	158.23

18055423	141.28	177.33	88.07
18047344	141.12	74.75	89.54
18041565	141.09	107.07	0.08
18047046	141.07	82.80	100.47
18035025	141.04	146.84	114.25
18031929	141.03	111.74	95.41
18051072	140.74	161.54	111.50
18041639	140.67	237.06	116.27
18035465	140.65	123.67	53.16
18032182	140.59	96.12	111.15
18032145	140.56	116.61	78.65
18035991	140.34	100.86	149.20
18036880	140.26	67.45	51.10
18039130	140.24	124.43	43078
18038190	139.91	216.07	148.96
18053228	139.84	125.48	127.90
18037768	139.72	95.42	177.84
18047148	139.64	174.70	41.32
18054246	139.51	188.79	110.89
18042237	139.29	96.02	174.86
18044404	139.27	170.30	194.62
18039058	139.18	98.36	103.64
18049725	139.15	104.24	108.37
18049749	139.00	102.90	134.88
18040847	138.75	103.60	93.64
18046371	138.38	93.32	14.77
18044137	138.30	134.26	128.56
18031833	138.27	81.46	116.06
18049026	138.22	181.36	221.41
18054622	138.05	114.48	46.70
18047468	137.96	166.61	147.51
18052433	137.91	113.90	57.10
18038006	137.89	114.20	125.58
18037692	137.80	102.55	156.34
18036341	137.79	62.72	66.13
18036620	137.68	130.59	71.54
18053399	137.35	18415	29646
18033293	137.02	113.91	184.00
18052787	136.94	146.55	113.90
18045226	136.65	61.78	19.66
18050320	136.59	121.60	108.64
18035705	136.55	139.03	148.56
18053539	136.53	141.78	224.12

18053249	136.53	141.62	106.18
18051046	136.47	129.39	90.97
18038211	136.12	301.96	0
18033801	136.05	124.23	163.34
18037608	136.03	107.75	217.91
18035217	135.76	174.57	155.58
18043110	135.75	27.76	16.58
18047087	135.66	186.03	109.76
18033741	135.57	55.29	163.92
18049449	135.35	72.61	64.51
18033149	135.12	144.02	64.64
18044890	134.80	49.96	27.20
18050642	134.71	71.33	64.11
18052968	134.60	152.09	58.45
18054341	134.50	33.41	23.48
18051352	134.21	100.74	164.47
18038614	134.10	99.69	137.49
18055107	134.01	176.73	107.03
18043846	133.78	198.20	68.69
18055084	133.77	73.06	93.62
18039524	133.74	128.63	152.71
18051688	133.71	145.14	183.72
18039146	133.71	116.28	14.25
18033067	133.68	147.46	304.56
18031487	133.45	98.74	102.30
18042002	133.35	128.80	498.84
18038116	132.97	86.18	337.70
18045992	132.90	119.14	136.68
18035309	132.83	144.20	154.85
18039826	132.78	163.39	101.39
18050906	132.60	165.67	127.26
18041699	132.38	84.33	66.86
18047636	132.28	110.83	46.18
18032615	131.97	182.43	107.79
18046719	131.91	100.50	79.19
18038390	131.59	111.12	85.18
18043408	131.53	70.70	50.13
18033844	131.42	101.69	121.21
18050081	131.32	167.92	214.73
18034451	131.26	204.51	123.21
18055158	131.22	168.16	150.28
18040339	131.12	61.25	45536
18032844	131.07	229.78	221.46

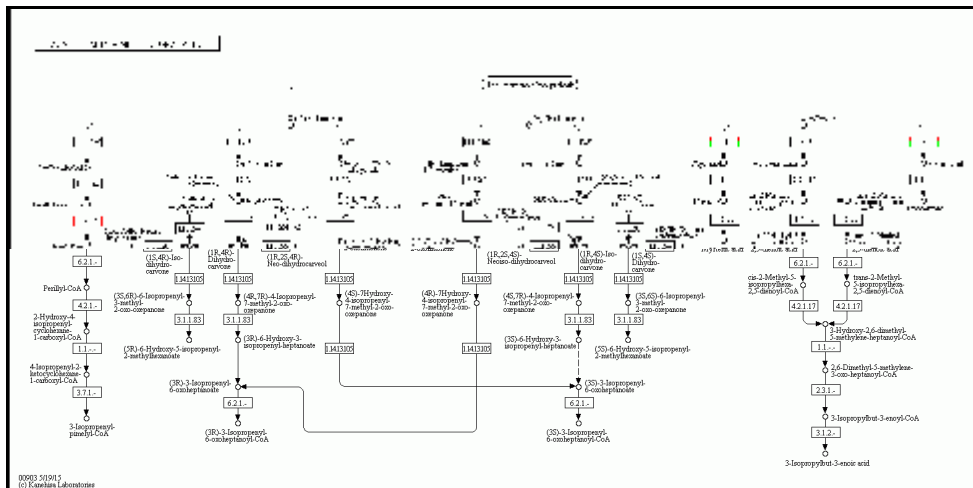
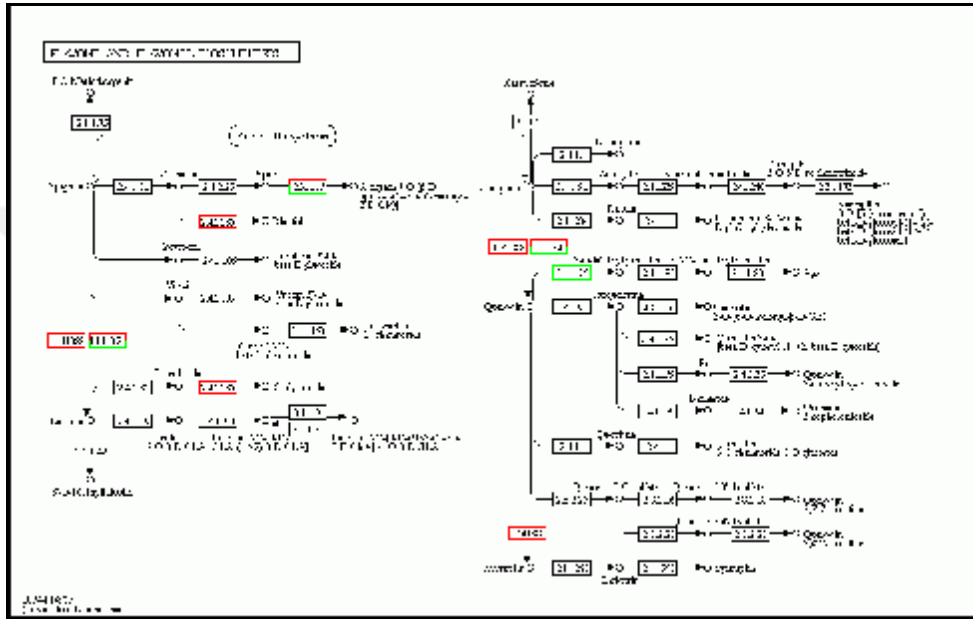
18046373	130.99	1663.36	129.74
18050984	130.79	70.74	93.17
18042889	130.71	71.31	70.97
18034725	130.57	66.36	219.09
18048656	130.51	126.23	170.53
18043239	130.39	258.47	43040
18055459	130.33	114.12	212.55
18048368	130.16	12206	0.50
18039428	129.94	148.82	34.16
18040619	129.48	50.64	100.00
18035577	129.30	192.93	101.95
18039849	129.29	166.79	172.49
18048958	129.22	100.34	165.21
18038742	128.93	111.24	116.19
18055205	128.71	239.91	130.03
18042686	128.57	93.40	54.29
18051680	128.49	56.16	69.89
18039141	128.45	114.69	113.62
18042803	128.44	162.58	132.20
18047690	128.24	175.99	96.56
18051708	127.95	137.10	151.60
18047435	127.90	96.41	77.03
18051937	127.84	135.28	257.70
18050644	127.73	27.51	104.49
18043406	127.69	64.76	88.84
18035342	127.67	101.54	122.51
18050154	127.65	129.24	25.69
18044823	127.27	80.12	68.03
18039702	127.18	61.03	99.01
18039050	127.13	151.43	70.49
18049772	127.05	95.61	146.50
18038562	126.94	74.66	75.52
18055507	126.88	138.21	141.83
18041965	126.67	101.23	113.05
18054128	126.66	99.54	79.60
18047403	126.53	84.65	49.70
18047338	126.38	250.36	192.27
18053817	126.28	121.88	60.06
18041011	126.24	73.09	530.33
18047654	126.01	119.37	174.58
18053703	125.92	83.85	145.74
18042373	125.89	154.29	74.23
18033052	125.76	74.08	56.36

18046686	125.75	140.98	87.24
18035011	125.70	196.80	204.47
18048396	125.68	98.63	127.49
18044562	125.59	142.27	117.00
18036075	125.51	110.88	59.55
18054244	125.50	115.84	166.19
18031666	125.37	105.57	134.45
18043345	125.27	71.38	61.44
18044261	125.26	154.88	94.90
18032740	125.19	99.77	77.13
18055602	125.07	95.03	79.04
18037101	124.89	107.44	107.14
18032155	124.89	236.07	87.01
18034359	124.48	115.15	35.00
18050074	124.01	124.08	130.06
18035289	123.95	39.81	105.40
18043343	123.74	81.04	144.13
18055630	123.67	104.59	96.93
18052589	123.28	135.03	193.64
18035602	123.25	63.67	223.41
18043511	123.17	185.95	163.74
18043211	123.00	75.25	26.23
18055613	122.96	82.67	71.43
18050464	122.62	45.46	80.46
18052541	122.57	130.42	83.50
18054679	122.52	160.04	110.72
18043839	122.52	31.79	14.56
18049584	122.50	129.59	57.81
18048250	122.35	209.21	78.51
18049409	122.34	149.70	2408.83
18032579	122.20	128.98	69.72
18040477	122.08	106.25	111.76
18056149	122.06	85.63	54.34
18037464	122.05	49.33	37.26
18050751	121.75	105.77	120.11
18037622	121.67	145.50	112.67
18035282	121.57	88.44	125.24
18048455	121.55	84.68	56.51
18044731	121.36	129.81	42945
18051534	121.32	88.00	62.04
18032655	121.16	102.50	77.18
18042750	121.09	103.01	121.10
18043779	120.98	75.49	133.47

18036545	120.97	82.98	28.53
18048275	120.85	88.38	124.45
18034994	120.83	124.80	29.99
18042895	120.60	16.84	67.54
18053183	120.54	108.37	173.88
18045107	120.46	191.63	32051
18045822	120.18	63.31	34.76
18041381	120.01	117.37	142.67
18054001	119.97	100.75	42974
18035066	119.75	111.89	393.59
18050339	119.69	218.22	163.73
18050199	119.67	85.73	86.95
18043324	119.54	42.56	182.08
18034746	119.45	198.28	79.34
18045249	119.45	79.15	92.26
18042255	119.40	124.32	67.73
18042922	119.02	73.86	43.09
18040963	118.62	99.67	91.63
18052577	118.41	127.35	51.04
18044386	118.28	72.83	75.63
18034951	118.27	99.46	61.43
18055822	118.03	73.83	60.12
18052222	117.67	67.17	14.56
18054046	117.66	44713	0
18052376	117.60	100.88	84.63
18047705	117.56	113.43	162.78
18032917	117.43	78.49	39.70
18034773	117.35	87.72	17.00
18031490	116.78	78.66	47.99
18054574	116.73	79.40	55.48
18041588	116.58	73.80	45047
18037760	116.43	86.81	109.25
18046211	116.35	151.14	137.02
18056007	116.34	103.98	73.06
18045412	116.29	117.57	194.90
18037339	115.88	105.49	134.46
18031217	115.85	57.16	40.21
18042523	115.84	111.27	34.20
18048393	115.73	122.51	92.17
18050738	115.73	86.60	81.74
18046835	115.54	122.32	166.55
18040594	115.51	138.98	202.82
18038519	115.22	110.45	30.78

18042172	115.05	86.37	36.18
18055639	114.89	99.12	114.70
18042733	114.79	85.87	40.60
18051328	114.68	87.60	109.52
18039445	114.62	128.41	201.16
18051251	114.61	110.59	188.66
18032255	114.60	138.37	115.30
18031831	114.58	128.69	36.10
18045932	114.42	82.27	151.92
18033921	114.16	77.19	62.55
18047485	114.11	21.19	29.84
18035857	113.90	56.11	70.38
18049583	113.50	104.85	160.66
18046229	113.48	82.08	79.46
18048796	113.44	115.77	52.69

- Upregüle (kırmızı çerçeve) ve downregüle (yeşil çerçeve) genler şekiller üzerinde belirtilmiştir.



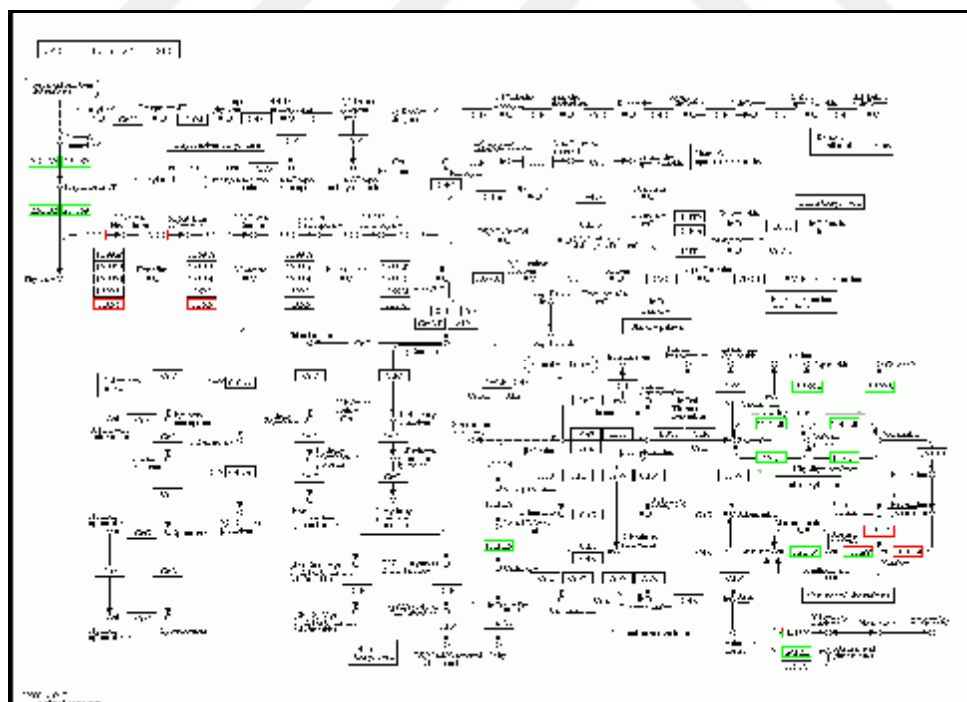
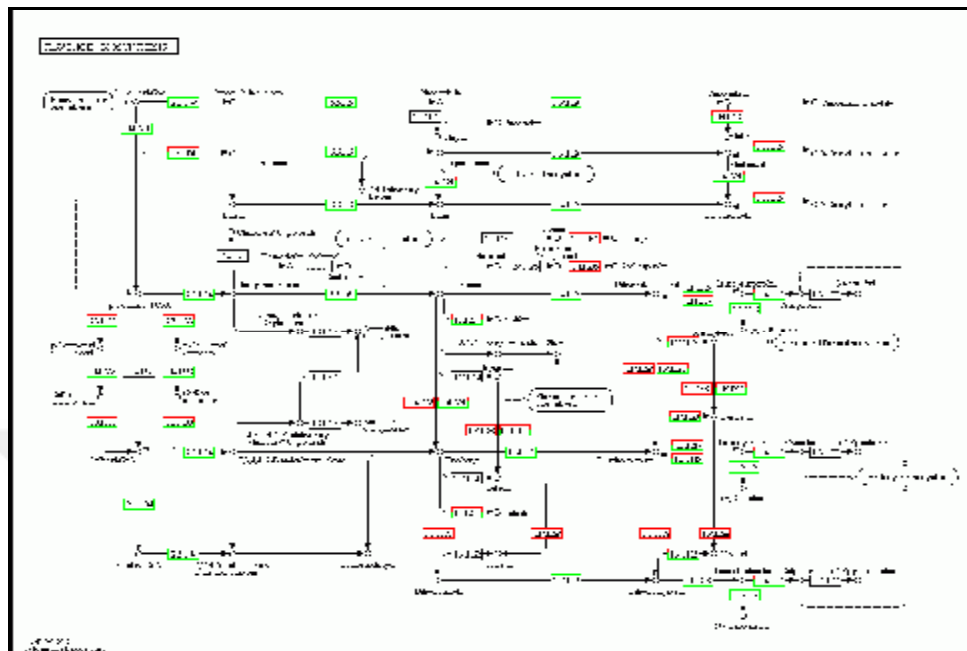


Diagram illustrating the electron transport chain (ETC) in the inner mitochondrial membrane, showing the flow of electrons and protons through various complexes and the resulting proton gradient used for ATP synthesis.

Complex I: NADH dehydrogenase

- Electron donor: NADH (NADH → NAD⁺ + H⁺ + 2e⁻)
- Electron acceptor: FMN (FMN → FMN[•])
- Electron carriers: Fe-S clusters, heme b (b_L, b_H), heme c₁, heme c, heme c₂, heme c₃, heme c₄, heme c₅, heme c₆, heme c₇, heme c₈, heme c₉, heme c₁₀, heme c₁₁, heme c₁₂, heme c₁₃, heme c₁₄, heme c₁₅, heme c₁₆, heme c₁₇, heme c₁₈, heme c₁₉, heme c₂₀, heme c₂₁, heme c₂₂, heme c₂₃, heme c₂₄, heme c₂₅, heme c₂₆, heme c₂₇, heme c₂₈, heme c₂₉, heme c₃₀, heme c₃₁, heme c₃₂, heme c₃₃, heme c₃₄, heme c₃₅, heme c₃₆, heme c₃₇, heme c₃₈, heme c₃₉, heme c₄₀, heme c₄₁, heme c₄₂, heme c₄₃, heme c₄₄, heme c₄₅, heme c₄₆, heme c₄₇, heme c₄₈, heme c₄₉, heme c₅₀, heme c₅₁, heme c₅₂, heme c₅₃, heme c₅₄, heme c₅₅, heme c₅₆, heme c₅₇, heme c₅₈, heme c₅₉, heme c₆₀, heme c₆₁, heme c₆₂, heme c₆₃, heme c₆₄, heme c₆₅, heme c₆₆, heme c₆₇, heme c₆₈, heme c₆₉, heme c₇₀, heme c₇₁, heme c₇₂, heme c₇₃, heme c₇₄, heme c₇₅, heme c₇₆, heme c₇₇, heme c₇₈, heme c₇₉, heme c₈₀, heme c₈₁, heme c₈₂, heme c₈₃, heme c₈₄, heme c₈₅, heme c₈₆, heme c₈₇, heme c₈₈, heme c₈₉, heme c₉₀, heme c₉₁, heme c₉₂, heme c₉₃, heme c₉₄, heme c₉₅, heme c₉₆, heme c₉₇, heme c₉₈, heme c₉₉, heme c₁₀₀
- Proton pumping: 4 H⁺ are pumped across the membrane.

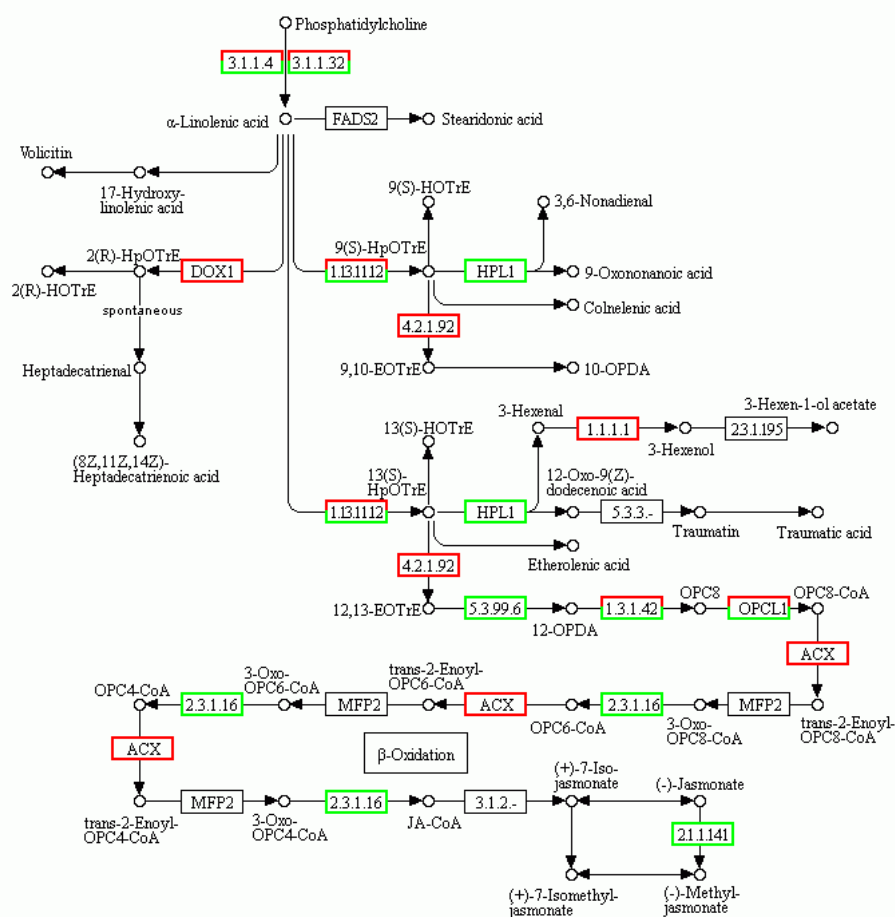
Complex II: Succinate dehydrogenase

- Electron donor: Succinate (Succinate → Succinate[•] + 2e⁻)
- Electron acceptor: FMN (FMN → FMN[•])
- Electron carriers: Fe-S clusters, heme b (b_L, b_H), heme c₁, heme c, heme c₂, heme c₃, heme c₄, heme c₅, heme c₆, heme c₇, heme c₈, heme c₉, heme c₁₀, heme c₁₁, heme c₁₂, heme c₁₃, heme c₁₄, heme c₁₅, heme c₁₆, heme c₁₇, heme c₁₈, heme c₁₉, heme c₂₀, heme c₂₁, heme c₂₂, heme c₂₃, heme c₂₄, heme c₂₅, heme c₂₆, heme c₂₇, heme c₂₈, heme c₂₉, heme c₃₀, heme c₃₁, heme c₃₂, heme c₃₃, heme c₃₄, heme c₃₅, heme c₃₆, heme c₃₇, heme c₃₈, heme c₃₉, heme c₄₀, heme c₄₁, heme c₄₂, heme c₄₃, heme c₄₄, heme c₄₅, heme c₄₆, heme c₄₇, heme c₄₈, heme c₄₉, heme c₅₀, heme c₅₁, heme c₅₂, heme c₅₃, heme c₅₄, heme c₅₅, heme c₅₆, heme c₅₇, heme c₅₈, heme c₅₉, heme c₆₀, heme c₆₁, heme c₆₂, heme c₆₃, heme c₆₄, heme c₆₅, heme c₆₆, heme c₆₇, heme c₆₈, heme c₆₉, heme c₇₀, heme c₇₁, heme c₇₂, heme c₇₃, heme c₇₄, heme c₇₅, heme c₇₆, heme c₇₇, heme c₇₈, heme c₇₉, heme c₈₀, heme c₈₁, heme c₈₂, heme c₈₃, heme c₈₄, heme c₈₅, heme c₈₆, heme c₈₇, heme c₈₈, heme c₈₉, heme c₉₀, heme c₉₁, heme c₉₂, heme c₉₃, heme c₉₄, heme c₉₅, heme c₉₆, heme c₉₇, heme c₉₈, heme c₉₉, heme c₁₀₀
- Proton pumping: 0 H⁺ are pumped across the membrane.

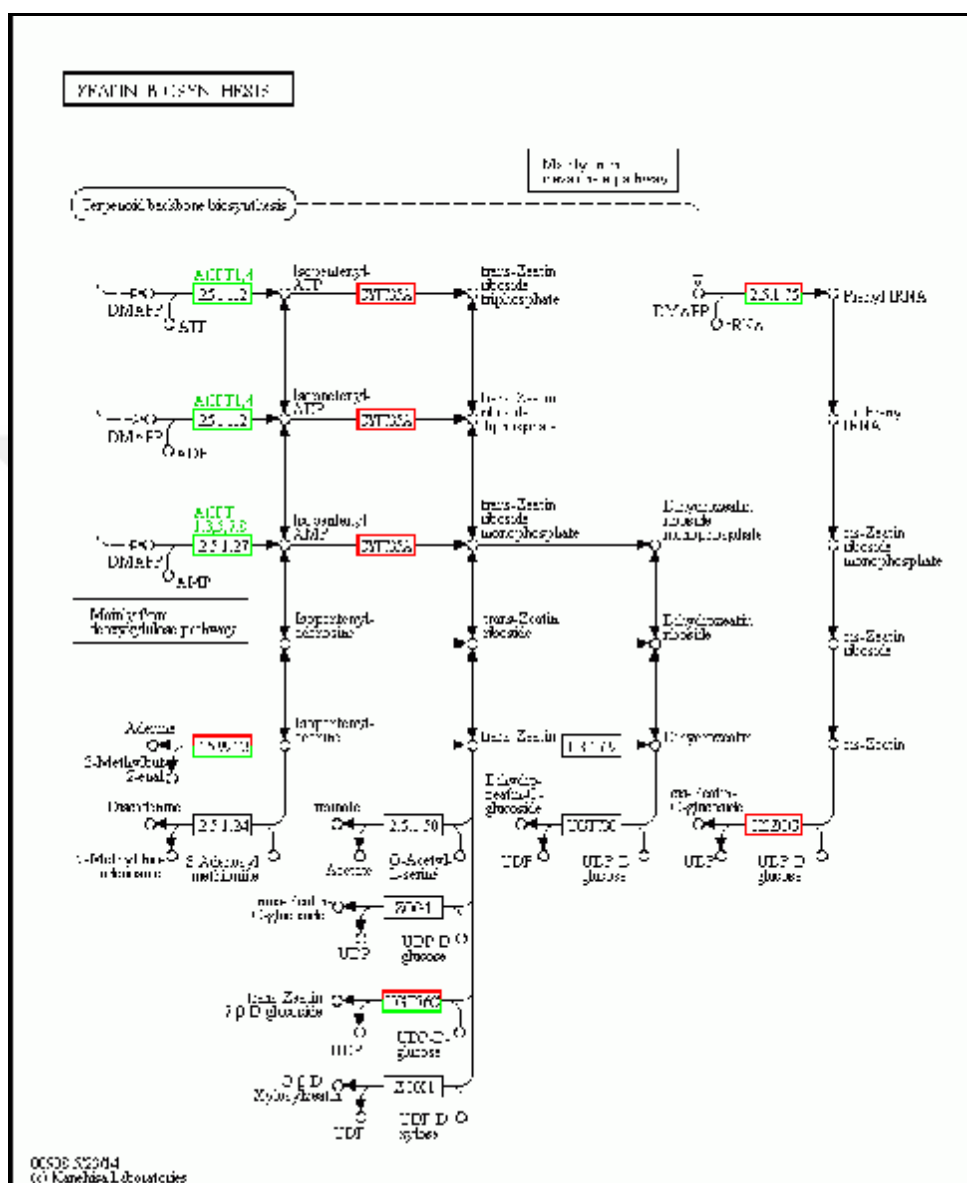
Complex III: Cytochrome bc₁ complex

- Electron donor: FMN[•] (FMN[•] → FMN + 2e⁻)
- Electron acceptor: heme b (b_L, b_H), heme c₁, heme c, heme c₂, heme c₃, heme c₄, heme c₅, heme c₆, heme c₇, heme c₈, heme c₉, heme c₁₀, heme c₁₁, heme c₁₂, heme c₁₃, heme c₁₄, heme c₁₅, heme c₁₆, heme c₁₇, heme c₁₈, heme c₁₉, heme c₂₀, heme c₂₁, heme c₂₂, heme c₂₃, heme c₂₄, heme c₂₅, heme c₂₆, heme c₂₇, heme c₂₈, heme c₂₉, heme c₃₀, heme c₃₁, heme c₃₂, heme c₃₃, heme c₃₄, heme c₃₅, heme c₃₆, heme c₃₇, heme c₃₈, heme c₃₉, heme c₄₀, heme c₄₁, heme c₄₂, heme c₄₃, heme c₄₄, heme c₄₅, heme c₄₆, heme c₄₇, heme c₄₈, heme c₄₉, heme c₅₀, heme c₅₁, heme c₅₂, heme c₅₃, heme c₅₄, heme c₅₅, heme c₅₆, heme c₅₇, heme c₅₈, heme c₅₉, heme c₆₀, heme c₆₁, heme c₆₂, heme c₆₃, heme c₆₄, heme c₆₅, heme c₆₆, heme c₆₇, heme c₆₈, heme c₆₉, heme c₇₀, heme c₇₁, heme c₇₂, heme c₇₃, heme c₇₄, heme c₇₅, heme c₇₆, heme c₇₇, heme c₇₈, heme c₇₉, heme c₈₀, heme c₈₁, heme c₈₂, heme c_{83</}

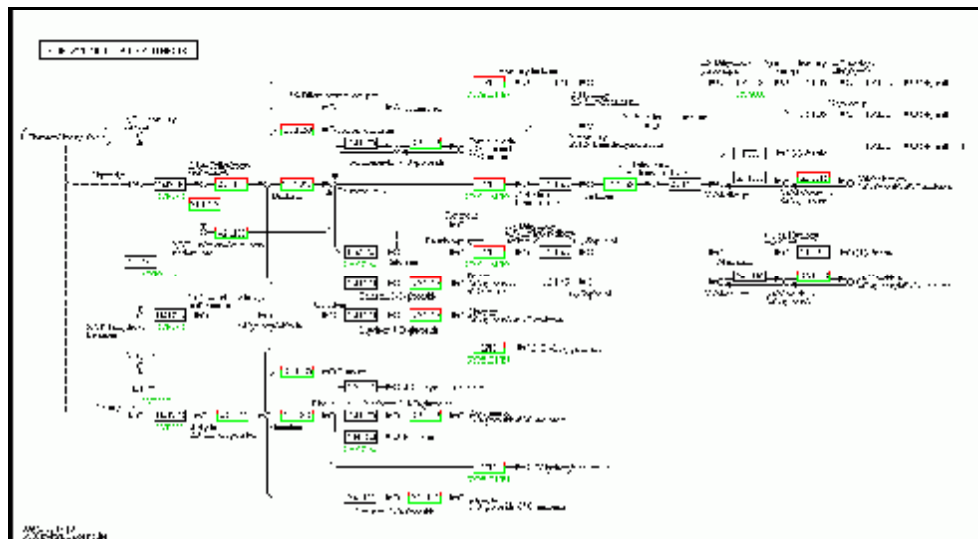
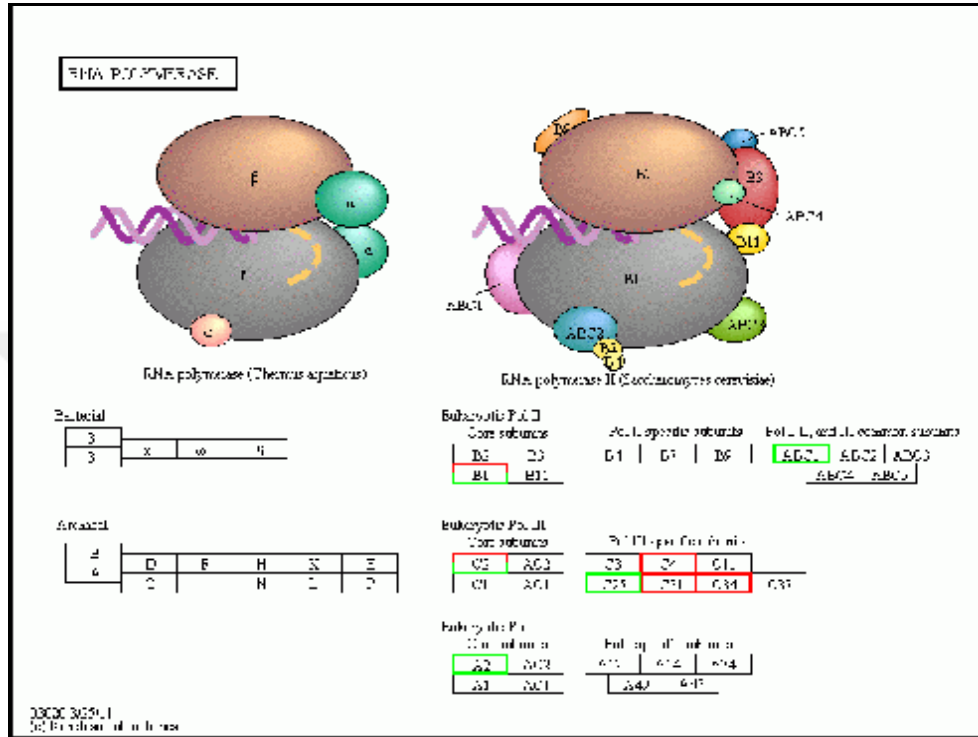
α-LINOLENIC ACID METABOLISM



00592 3/3/16
(c) Kanehisa Laboratories



EK 5. Altıntop albedo ve kallus örnekleri arasında tespit edilen önemli yollardan bazıları



EK 6. Portakal albedo ve altıntop albedo örnekleri arasında tespit edilen yolaklar ile farklı seviyelerde ifade edilen genler

Yolak	Farklı Seviyelerde İfade Olan Genler
Sekonder metabolit biyosentezi	18053379, 18052870, 18053380, 18035346, 18051991, 18052075, 18032503, 18051174, 18043374, 18055930, 18041303, 18053378, 18035810, 18037243, 18042367, 18047035, 18049734, 18032971, 18039211, 18051976, 18033838, 18043059, 18033231, 18055931, 18046315, 18053375, 18053693, 18032950, 18032915, 18045385, 18035202, 18033621, 18035844, 18035420, 18034008, 18055926, 18046904, 18036335, 18046332, 18034351, 18046373, 18042520, 18044914, 18041215, 18050790, 18052073, 18043771, 18034657, 18047826, 18048899, 18034921, 18043077, 18045394, 18048848, 18046009, 18033139, 18043706, 18052503, 18039129, 18053376, 18038016, 18044579, 18032770, 18042673, 18031841, 18053357, 18053087, 18055018, 18054575, 18046088, 18032199, 18043657, 18055442, 18034523, 18045481, 18055612, 18041836, 18039072, 18041447, 18053702, 18036001, 18053694, 18040730, 18037523, 18036717, 18045345, 18034331, 18031378, 18047949, 18043978, 18044271, 18040648, 18032527, 18042055, 18046698, 18043707, 18036649, 18037059, 18036987, 18033207, 18055522, 18043141, 18038527, 18052964, 18050954, 18050157, 18045116, 18032274, 18052500, 18040203, 18038971, 18031349, 18048227, 18037402, 18049333, 18054207, 18053354, 18048159, 18034336, 18033737, 18035126, 18037442, 18044580, 18036672, 18045386, 18048579, 18049347, 18039477, 18048324, 18033346, 18033168, 18037982, 18041707, 18043465, 18046374, 18051123, 18056050, 18049291, 18038922, 18041156, 18036686, 18054902, 18033472, 18045677, 18042583, 18035820, 18047373, 18038211, 18044345, 18037666, 18055363, 18034521, 18044581, 18033119, 18031560, 18035657, 18039720, 18051178, 18050174, 18055711, 18055161, 18042808, 18032881, 18049607, 18049577, 18041637, 18054683, 18036865, 18048226, 18032097, 18031383, 18046505, 18054033, 18052825, 18042247, 18048463, 18044795, 18037603, 18054044, 18035689, 18046501, 18053328, 18053393, 18031784, 18043888, 18055549, 18034842, 18048873, 18039960, 18040550, 18048888, 18044659, 18031586, 18053646, 18048787, 18041651, 18041864, 18033522, 18054054, 18032661, 18051854, 18036959, 18052395, 18042368,

	18054047, 18032436, 18036175, 18048465, 18042220, 18040881, 18050006, 18048366, 18051781, 18044359, 18041638, 18049613, 18039998, 18045944, 18038866, 18032717, 18050524, 18037660, 18054041, 18032624, 18031267, 18048368, 18053797, 18054046, 18052336, 18032287, 18046298, 18036720, 18031315, 18055806, 18032415, 18052497, 18043574, 18038076, 18034203, 18043277, 18040739, 18044066, 18035688, 18033532, 18051456, 18031828, 18042815, 18041090, 18052826, 18049295, 18054598, 18034358, 18036268, 18052469, 18041877, 18051954, 18053426, 18051782, 18036838, 18036789, 18042221, 18045301, 18045747, 18036100, 18049715, 18043571, 18037575, 18039663, 18033528, 18036211, 18049369, 18051920, 18038903, 18042895, 18049232, 18041363, 18047966, 18042075, 18049425, 18032333, 18034362, 18042779, 18036490, 18043023, 18031956, 18055294, 18037047, 18040291, 18036876, 18037218, 18043319, 18043947, 18052074, 18033756, 18038426, 18041608, 18052053, 18049529, 18049092, 18047485, 18054754, 18051922, 18040529, 18035314, 18036870, 18054600, 18055555, 18043310, 18032212, 18039078, 18048849, 18036030, 18050729, 18035451, 18054234, 18053048, 18053428, 18044645, 18053427, 18051743, 18039952, 18033130, 18050969, 18043839, 18046916, 18046341, 18042667, 18043266, 18049302, 18043881, 18041933, 18033691, 18050571, 18046023, 18035869, 18043035, 18034507, 18033919, 18032870, 18034437, 18036828, 18052333, 18045690, 18039962, 18041446, 18033218, 18033897, 18041083, 18053348, 18035682, 18049149, 18038923, 18050625, 18031215, 18036840, 18036267, 18035283, 18034322, 18038643, 18053057, 18054378, 18055805, 18032428, 18047923, 18043163, 18052054, 18048634, 18044238, 18037475, 18048923, 18045947, 18034283, 18036308, 18045355, 18039809, 18042102, 18032721, 18037601, 18035960, 18034824, 18044018, 18044122, 18048266, 18051039, 18046366, 18040666, 18035109, 18044657, 18039250, 18033678, 18047480, 18033836, 18042211, 18032828, 18031262, 18044009, 18039082, 18038372, 18039904, 18031532, 18037512, 18031502, 18033435, 18044890, 18050464, 18052371, 18043188, 18041198, 18034677, 18048807, 18051020, 18038722, 18040645, 18047033, 18047142, 18041687, 18040761, 18056081, 18040619, 18036033, 18040088, 18035114, 18032690, 18035355, 18047993, 18050611, 18037897, 18035870, 18037464, 18033815, 18039079, 18031530, 18044893, 18035556, 18050543, 18050747, 18036721, 18042333, 18046114, 18052980, 18051070, 18040726, 18047490, 18048205, 18033481, 18041776, 18048469, 18054921, 18032013, 18038758, 18050323, 18051450, 18049272, 18045405, 18039038, 18033903, 18054571, 18039794, 18045463, 18047488, 18045793, 18050365, 18047932, 18042258, 18055996, 18047244, 18051925, 18047896, 18041621, 18046174, 18051504, 18035442, 18045956, 18042578, 18050843, 18032372, 18053288, 18043081, 18042441, 18034756, 18037957, 18036387, 18033721, 18039702, 18034599, 18047003, 18033112, 18032073, 18037805, 18055962, 18056005, 18034922, 18050359, 18045776, 18054605, 18053716, 18053799, 18041945, 18033338, 18037780, 18035857, 18037155, 18032820, 18049344, 18048001, 18034982, 18032578, 18038408, 18031181, 18035998
--	--

Metabolik yollar	18048834, 18053379, 18052870, 18055184, 18053380, 18035346, 18051679, 18051991, 18040142, 18043374, 18048043, 18052966, 18052263, 18055930, 18038806, 18042724, 18041303, 18053378, 18035312, 18035810, 18048295, 18042367, 18047389, 18032893, 18044759, 18043150, 18032971, 18054640, 18039211, 18051976, 18047316, 18033470, 18033838, 18043059, 18048573, 18033231, 18033545, 18048835, 18055931, 18034435, 18046315, 18053375, 18055374, 18034517, 18036285, 18041368, 18032950, 18031919, 18032915, 18045385, 18045018, 18044314, 18037561, 18050333, 18033621, 18035844, 18035420, 18034008, 18055926, 18032601, 18036742, 18046904, 18047712, 18049934, 18036335, 18052664, 18043070, 18046332, 18052665, 18034351, 18042520, 18033565, 18041215, 18050790, 18036821, 18034657, 18047826, 18048899, 18043077, 18037739, 18041898, 18040169, 18042135, 18053149, 18045394, 18048819, 18034327, 18051674, 18051673, 18048848, 18046009, 18033139, 18043706, 18040143, 18052503, 18044277, 18033478, 18031803, 18053376, 18038016, 18044579, 18052496, 18041602, 18032770, 18042673, 18031841, 18054420, 18051773, 18053087, 18032558, 18048256, 18054575, 18048928, 18052160, 18033175, 18050078, 18046088, 18032199, 18055801, 18043657, 18050903, 18034523, 18050256, 18047842, 18046770, 18052551, 18045481, 18044450, 18055612, 18050105, 18041836, 18039072, 18041447, 18036001, 18040730, 18036717, 18051516, 18050134, 18045345, 18034331, 18047949, 18043978, 18053798, 18041842, 18044271, 18040648, 18043264, 18049341, 18032527, 18042055, 18050368, 18034295, 18036649, 18038321, 18031518, 18037059, 18044498, 18036987, 18033207, 18055522, 18043141, 18046474, 18038527, 18052964, 18050954, 18050157, 18045116, 18032274, 18052500, 18040203, 18043460, 18052623, 18043195, 18050294, 18048227, 18037402, 18049333, 18054207, 18040060, 18053354, 18048159, 18034336, 18035126, 18037442, 18037835, 18044580, 18037118, 18050208, 18041035, 18035184, 18045512, 18056151, 18034019, 18036422, 18055486, 18054222, 18036672, 18042735, 18033386, 18045386, 18050948, 18040780, 18036119, 18048579, 18049347, 18046948, 18039477, 18032060, 18048324, 18033346, 18033168, 18037982, 18044631, 18040199, 18054092, 18043465, 18047722, 18040869, 18053722, 18056050, 18032780, 18042711, 18050027, 18032006, 18049291, 18042626, 18038922, 18048572, 18048335, 18049430, 18041156, 18038672, 18052557, 18034332, 18054902, 18054887, 18041841, 18046805, 18036843, 18033472, 18052370, 18045677, 18032180, 18046804, 18049312, 18035820, 18036428, 18041502, 18055495, 18047373, 18036841, 18038211, 18040299, 18044345, 18031421, 18055363, 18034521, 18044581, 18033119, 18031560, 18050257, 18044229, 18052250, 18055038, 18043835, 18042860, 18038877, 18044885, 18046831, 18042027, 18033600, 18033198, 18047365, 18050369, 18054847, 18039720, 18038879, 18051178, 18047935, 18045884, 18051735, 18050608, 18055711, 18040036, 18041060, 18042808, 18049607, 18040753, 18049577, 18041637, 18038199, 18036865, 18052547, 18049606, 18048226, 18032097, 18031642, 18046505, 18054033, 18052825, 18042247, 18053615, 18051652, 18048463, 18052269, 18044795, 18031742, 18037603, 18032287, 18043396, 18046298, 18054889,
------------------	--

	18045612, 18031315, 18055806, 18032415, 18052497, 18046154, 18043574, 18038076, 18034203, 18051745
Flavonoid biosynthesis	18053379, 18052870, 18053380, 18053378, 18033231, 18053375, 18053693, 18035420, 18034008, 18034351, 18041215, 18033139, 18053376, 18041836, 18041447, 18053702, 18053694, 18049333, 18048579, 18033472, 18038211, 18044391, 18042808, 18041637, 18032097, 18040550, 18041651, 18042220, 18044359, 18041638, 18032287, 18055806, 18038076, 18040739, 18042221, 18049715, 18033528, 18042895, 18047966, 18036490, 18043023, 18043319, 18038426, 18049529, 18047485, 18040529, 18036870, 18035451, 18033130, 18041933, 18034507, 18041446, 18053348, 18036840, 18053057, 18054378, 18037475, 18048923, 18035960, 18047480, 18037512, 18040645, 18047490, 18050323, 18047488, 18051925, 18037805, 18049344, 18032578
Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis	18045385, 18034008, 18034351, 18041215, 18033139, 18041836, 18037442, 18045386, 18035820, 18038211, 18032881, 18055549, 18034842, 18039960, 18031899, 18031586, 18041651, 18033522, 18032661, 18051854, 18054620, 18042220, 18032717, 18040739, 18042221, 18036100, 18049715, 18033528, 18042895, 18042779, 18037047, 18043319, 18038426, 18040529, 18036870, 18032212, 18035451, 18051743, 18041933, 18043035, 18053348, 18053057, 18048634, 18048923, 18035960, 18044009, 18037512, 18041198, 18040645, 18037897, 18042258, 18037805, 18041945
Fenilpropanoid biyosentezi	18051174, 18043374, 18032915, 18035844, 18035420, 18034008, 18036335, 18034351, 18042520, 18041215, 18043077, 18048848, 18033139, 18052503, 18053087, 18054575, 18041836, 18041447, 18043978, 18044271, 18046698, 18050157, 18052500, 18035126, 18049347, 18037982, 18051123, 18038211, 18033119, 18055711, 18036865, 18046505, 18054033, 18035689, 18046501, 18031784, 18044659, 18048787, 18041651, 18041864, 18052395, 18042220, 18050006, 18048366, 18041638, 18037660, 18031267, 18048368, 18046298, 18052497, 18034203, 18040739, 18035688, 18033532, 18055849, 18051456, 18041090, 18036838, 18042221, 18045747, 18049715, 18043571, 18033528, 18037076, 18042895, 18049425, 18037215, 18043319, 18043947, 18038426, 18041608, 18054754, 18040529, 18036870, 18054600, 18032212, 18048849, 18035451, 18054497, 18043266, 18041933, 18034437, 18052333, 18041446, 18033218, 18053348, 18053057, 18054378, 18044238, 18048923, 18036308, 18032721, 18035960, 18044122, 18044657, 18033836, 18032828, 18031262, 18037512, 18052371, 18038722, 18040645, 18056081, 18036033, 18040088, 18035114, 18037464, 18051070, 18038758, 18033903, 18045463, 18050365, 18047896, 18037805, 18053716, 18037780, 18037155, 18049344

İzoflavonoid biyosentezi	18032132, 18049333, 18048053, 18035820, 18032881, 18031383, 18053393, 18055549, 18034842, 18039960, 18031899, 18031586, 18033522, 18032661, 18051854, 18054620, 18032717, 18031828, 18033224, 18051743, 18044783, 18055667, 18046030
Triptofan metabolizması	18042367, 18047389, 18037561, 18033621, 18047712, 18046373, 18044914, 18044277, 18044579, 18032770, 18048256, 18046088, 18045345, 18044580, 18036422, 18046374, 18044581, 18043155, 18032700, 18048151, 18044273, 18056142, 18041363, 18045827, 18037053, 18036030, 18036008, 18052683, 18047387, 18046366, 18040761, 18049890, 18033112, 18050359, 18048154, 18041945
Flavon ve flavonol biyosentezi	18053379, 18052870, 18053380, 18053378, 18032132, 18033231, 18053375, 18053376, 18048579, 18048053, 18044391, 18046505, 18035689, 18046501, 18050006, 18048366, 18048368, 18035688, 18033224, 18049232, 18043947, 18032212, 18044783, 18055667, 18038758, 18050323, 18046030
Monoterpenoid biyosentezi	18047035, 18033168, 18051781, 18051782, 18045956
Karotenoid biyosentezi	18051976, 18042041, 18052964, 18048159, 18043465, 18039758, 18034521, 18054044, 18054054, 18036716, 18054047, 18038866, 18054041, 18054046, 18049295, 18034834, 18051922, 18050729, 18039952, 18033897, 18035283, 18033641, 18037601, 18035870, 18032305, 18049272, 18034599
Limonen ve pinen degradasyonu	18045385, 18046088, 18037442, 18045386, 18035820, 18054620, 18036100, 18042779, 18037047, 18043035, 18048634, 18044009, 18041198, 18037897, 18042258, 18041945
Seskiterpenoid ve triterpenoid biyosentezi	18041303, 18039211, 18033838, 18040730, 18042055, 18048227, 18033168, 18055363, 18048226, 18048888, 18053646, 18051781, 18043277, 18051782, 18050571, 18032870, 18050625
Fotosentez	18051679, 18043060, 18051773, 18043195, 18055495, 18051735, 18042569, 18050746, 18046547, 18048643, 18054593, 18034913, 18050848, 18051680

EK 7. Portakal albedo ve kallus örnekleri arasında tespit edilen yolaklar ile farklı seviyelerde ifade edilen genler

Yolak	Farklı Seviyelerde İfade Olan Genler
Sekonder metabolit biyosentezi	18042245, 18033040, 18036678, 18044502, 18055365,
	18042182, 18046254, 18042812, 18052457, 18032203,
	18034137, 18052122, 18043889, 18049358, 18049345,
	18051991, 18038291, 18046713, 18052466, 18053176,
	18046882, 18032361, 18048749, 18053380, 18053379,
	18037981, 18033347, 18052870, 18038757, 18033838,
	18037360, 18042246, 18049363, 18049362, 18050721,
	18049951, 18043059, 18048798, 18032359, 18055533,
	18053177, 18032205, 18033739, 18033947, 18035346,
	18049361, 18042069, 18055363, 18050152, 18031198,
	18053378, 18038586, 18039171, 18036793, 18045260,
	18032915, 18049347, 18045315, 18031841, 18037287,
	18053360, 18042181, 18038330, 18055509, 18045385,
	18047456, 18042301, 18043917, 18046299, 18041854,
	18047440, 18043771, 18043796, 18036925, 18052460,
	18053382, 18036794, 18053801, 18051976, 18038596,
	18032950, 18054575, 18050151, 18048242, 18045592,
	18052503, 18033275, 18053381, 18033879, 18035584,
	18040111, 18036080, 18043840, 18044452, 18052075,
	18052997, 18050706, 18052501, 18045778, 18039477,
	18047035, 18046341, 18037243, 18035126, 18054207,
	18045394, 18053047, 18042369, 18042520, 18051788,
	18050546, 18046298, 18042673, 18048829, 18046700,
	18046315, 18034523, 18052071, 18034459, 18049346,
	18055266, 18044432, 18036176, 18038197, 18052462,
	18041946, 18053328, 18043657, 18036838, 18031839,
	18044430, 18045561, 18037787, 18044271, 18032527,
	18034430, 18050571, 18052072, 18039359, 18034756,
	18037442, 18054210, 18046590, 18043706, 18052500,
	18036802, 18043462, 18041861, 18053375, 18053797,
	18041447, 18053799, 18039140, 18036967, 18046866,
	18032177, 18048340, 18031840, 18036805, 18037064,
	18037191, 18041200, 18035482, 18046576, 18044642,
	18034674, 18039123, 18037523, 18044431, 18046556,
	18051852, 18045928, 18036308, 18034658, 18037327,
	18031467, 18055018, 18038922, 18040531, 18039549,
	18053165, 18039720, 18055676, 18044762, 18037660,
	18055522, 18042630, 18046009, 18044011, 18056023,
	18046088, 18038827, 18041531, 18034657, 18035420,
	18046332, 18051945, 18034652, 18045386, 18054598,
	18033621, 18038511, 18038860, 18053694, 18042665,
	18031746, 18032353, 18053353, 18043571, 18035638,
	18032270, 18047949, 18054377, 18055121, 18048357,
	18039181, 18041945, 18032690, 18049291, 18031375,
	18039069, 18048848, 18033472, 18039962, 18031241,
	18055612, 18032274, 18045562, 18043035, 18054042,

	18036649,	18055161,	18052073,	18036914,	18044098,
	18048849,	18042617,	18049696,	18041931,	18036717,
	18043998,	18040008,	18042368,	18032436,	18048983,
	18040881,	18052498,	18036082,	18035112,	18035834,
	18044009,	18052360,	18056050,	18035741,	18049083,
	18049500,	18046239,	18034101,	18042438,	18043086,
	18033737,	18044013,	18044387,	18047191,	18039660,
	18041198,	18038024,	18045777,	18042779,	18035442,
	18037740,	18031595,	18055481,	18032887,	18040959,
	18035066,	18054901,	18050729,	18053376,	18034358,
	18043266,	18036259,	18047923,	18056072,	18055294,
	18045694,	18050513,	18034322,	18035484,	18050790,
	18054754,	18053702,	18034982,	18048324,	18041776,
	18051971,	18042075,	18044345,	18040645,	18047044,
	18046916,	18053048,	18039028,	18035333,	18034884,
	18047806,	18033954,	18032624,	18036289,	18052374,
	18040184,	18040665,	18049344,	18039063,	18031254,
	18054178,	18045656,	18031181,	18034356,	18044197,
	18038162,	18047932,	18037202,	18044556,	18035589,
	18042022,	18045345,	18034099,	18033075,	18031249,
	18043319,	18035477,	18035159,	18038754,	18044644,
	18035583,	18031560,	18035541,	18045387,	18045463,
	18032954,	18037192,	18045677,	18051670,	18035447,
	18043267,	18031445,	18044636,	18036672,	18048899,
	18040648,	18041836,	18035960,	18034507,	18045302,
	18042840,	18037658,	18033119,	18046904,	18046114,
	18042459,	18042808,	18050006,	18038211,	18054046,
	18039960,	18054041,	18049733,	18032881,	18035689,
	18035688,	18049577,	18050625,	18033522,	18041446,
	18048888,	18049607,	18048366,	18039078,	18037752,
	18040761,	18051020,	18033218,	18032717,	18051782,
	18053428,	18043279,	18041363,	18043707,	18055420,
	18042247,	18043310,	18041090,	18049715,	18036100,
	18045727,	18042102,	18041637,	18043280,	18040911,
	18037292,	18031828,	18054378,	18036959,	18047966,
	18052053,	18053393,	18052469,	18043410,	18043258,
	18048923,	18036865,	18046699,	18044645,	18053427,
	18039072,	18053646,	18053426,	18036047,	18052054,
	18034103,	18035875,	18048226,	18037588,	18052826,
	18032097,	18031383,	18045039,	18054054,	18036987,
	18054033,	18052825,	18032661,	18039168,	18052487,
	18046698,	18038971,	18038380,	18046364,	18044657,
	18048463,	18048368,	18042293,	18032870,	18037603,
	18054044,	18042421,	18038527,	18040475,	18037850,
	18043027,	18042032,	18040730,	18046174,	18047244,
	18041877,	18046011,	18043188,	18033168,	18034921,
	18041608,	18044393,	18055549,	18055555,	18045084,
	18034842,	18043163,	18034351,	18048873,	18037494,
	18031209,	18048465,	18040550,	18037048,	18045038,
	18037906,	18043514,	18054047,	18052336,	18043277,
	18031586,	18037031,	18039745,	18037218,	18032372,
	18045086,	18035854,	18037691,	18048266,	18041864,

Metabolik yolaklar	18042245,	18047042,	18053823,	18036678,	18044502,
	18047848,	18055184,	18055365,	18042182,	18046254,
	18048834,	18042812,	18040256,	18032893,	18052457,
	18032203,	18034137,	18048346,	18052122,	18043889,
	18051679,	18034517,	18042401,	18047698,	18048043,
	18049345,	18051991,	18036821,	18040142,	18038291,
	18046713,	18050256,	18047702,	18052466,	18053176,
	18037602,	18052966,	18040169,	18046882,	18032361,
	18048749,	18052263,	18053380,	18045852,	18053379,
	18037981,	18052688,	18033347,	18052870,	18047847,
	18038757,	18033838,	18047703,	18047389,	18037360,
	18055118,	18042246,	18041989,	18044759,	18043059,
	18045018,	18048798,	18041368,	18042135,	18032359,
	18055533,	18053177,	18032205,	18033739,	18033947,
	18047316,	18035346,	18047846,	18050078,	18042724,
	18042069,	18055363,	18044435,	18035315,	18052474,
	18055217,	18050152,	18031198,	18053378,	18038586,
	18044309,	18036793,	18041655,	18045260,	18055119,
	18032915,	18049347,	18034249,	18045315,	18031841,
	18037287,	18048583,	18053360,	18042181,	18038330,
	18055509,	18045385,	18047712,	18047456,	18042301,
	18041898,	18034444,	18046299,	18044924,	18050244,
	18046437,	18047440,	18033025,	18044713,	18034435,
	18032601,	18052855,	18055218,	18043796,	18036925,
	18052901,	18033353,	18043150,	18053382,	18036794,
	18046005,	18040170,	18053801,	18051976,	18031245,
	18040658,	18031919,	18033394,	18038796,	18038596,
	18032950,	18054575,	18046170,	18050151,	18033848,
	18054716,	18048242,	18045592,	18052503,	18033275,
	18053381,	18035584,	18040111,	18036080,	18043840,
	18044452,	18031426,	18035010,	18052997,	18050706,
	18043967,	18052501,	18045778,	18039477,	18044278,
	18047551,	18046341,	18046879,	18035126,	18041628,
	18050900,	18054207,	18045394,	18053047,	18042520,
	18055551,	18050546,	18046298,	18042673,	18048829,
	18038615,	18054549,	18052861,	18046315,	18052634,
	18038734,	18052160,	18047842,	18034523,	18055373,
	18051549,	18052623,	18034459,	18037093,	18049346,
	18037309,	18055266,	18044560,	18036176,	18038197,
	18049562,	18052462,	18041946,	18054194,	18053328,
	18043657,	18036838,	18048445,	18031419,	18039438,
	18045561,	18037787,	18052860,	18044271,	18032723,
	18032527,	18048155,	18034430,	18050571,	18036645,
	18041631,	18039359,	18034756,	18055495,	18052032,
	18055801,	18037442,	18054210,	18037118,	18046590,
	18037600,	18043706,	18052598,	18052500,	18036802,
	18050607,	18033175,	18043462,	18049897,	18047200,
	18040143,	18036133,	18041861,	18053375,	18035359,
	18053797,	18041447,	18053799,	18047722,	18047568,
	18039140,	18036967,	18046866,	18043195,	18041852,
	18049341,	18034457,	18032177,	18032929,	18048701,
	18048340,	18042510,	18035312,	18031840,	18036805,

	18037064, 18056047, 18037191, 18035158, 18037744, 18041200, 18035482, 18046576, 18044642, 18034674, 18039123, 18032035, 18050746, 18046556, 18045520, 18055395, 18048680, 18045928, 18036308, 18051773, 18034658, 18037327, 18047365, 18042860, 18038673, 18038922, 18038877, 18040531, 18039549, 18047845, 18038387, 18053165, 18039720, 18055676, 18040399, 18040753, 18031830, 18044762, 18037660, 18041143, 18055522, 18037725, 18049565, 18045615, 18042630, 18033565, 18046009, 18044011, 18056023, 18049430, 18054261, 18040123, 18046088, 18038827, 18041531, 18034657, 18036681, 18035420, 18045352, 18038984, 18038940, 18032221, 18036841, 18041679, 18046332, 18052152, 18051945, 18037749, 18044485, 18031357, 18050608, 18045386, 18045866, 18053519, 18054598, 18051151, 18041775, 18033621, 18049269, 18038511, 18054465, 18038860, 18033194, 18031746, 18032353, 18037158, 18053353, 18043571, 18051200, 18035497, 18035638, 18032270, 18047949, 18054377, 18044690, 18055586, 18040473, 18055121, 18033272, 18041134, 18048357, 18039181, 18041945, 18040228, 18049291, 18031375, 18049193, 18039069, 18049279, 18048848, 18032558, 18033472, 18032894, 18045612, 18039962, 18031241, 18055612, 18032274, 18055537, 18045562, 18035711, 18043035, 18054042, 18046168, 18036649, 18033478, 18036914, 18044098, 18044075, 18051843, 18048849, 18042617,
Fotosentez	18051679, 18043967, 18046879, 18035077, 18052634, 18043060, 18044560, 18031419, 18041631, 18055495, 18052598, 18043195, 18050746, 18045520, 18051773, 18049565, 18040123, 18037749, 18045866, 18049269, 18041845, 18046168, 18033147, 18044399, 18042493, 18036420, 18051897, 18034566, 18050848, 18054593, 18051702, 18050406, 18049304, 18040412, 18052292, 18053462, 18055418
İzoflavonoid biyosentezi	18032132, 18032784, 18037064, 18051852, 18032105, 18050842, 18038126, 18055186, 18035834, 18048053, 18039960, 18032881, 18033522, 18032717, 18044555, 18031828, 18033224, 18053393, 18031383, 18032661, 18044783, 18055549, 18034842, 18046030, 18031899, 18031586, 18044554, 18051854, 18055666, 18032737, 18051743, 18051641, 18031831, 18035820, 18055667, 18033577
Limonen ve pinen degradasyonu	18037287, 18045385, 18041946, 18037442, 18037064, 18041200, 18044011, 18046088, 18041531, 18045386, 18041945, 18043035, 18044098, 18043998, 18035834, 18044009, 18043086, 18044013, 18041198, 18042779, 18045694, 18045387, 18036100, 18044393, 18037048, 18036882, 18043085, 18042767, 18037047, 18042343, 18043036, 18043046, 18035820, 18042258, 18045695

Flavon ve flavonol biyosentezi	18042182, 18032132, 18053375, 18038126, 18035689, 18033224, 18044391, 18045154, 18033231, 18038758	18038291, 18053378, 18039140, 18055186, 18035688, 18035875, 18046030, 18046501, 18055667,	18053380, 18053382, 18032177, 18053376, 18048366, 18045039, 18045038, 18055666, 18048580,	18053379, 18053381, 18032105, 18048053, 18044555, 18044783, 18044554, 18032737, 18050323,	18052870, 18032784, 18050842, 18050006, 18040911, 18048368, 18032212, 18043947, 18033577,
Diterpenoid biyosentezi	18049345, 18034459, 18047923, 18038754, 18054378, 18041877, 18049179, 18034033, 18047924, 18054374,	18053176, 18041447, 18055294, 18044644, 18044645, 18043188, 18043147, 18034961, 18053323, 18055434,	18046882, 18054377, 18046916, 18035541, 18052487, 18043163, 18031903, 18034519, 18044495, 18047106	18050721, 18032690, 18034884, 18041446, 18042293, 18047141, 18048787, 18038866, 18035355,	18049951, 18049083, 18031181, 18043310, 18046174, 18039951, 18049178, 18054683, 18041188,
Karotenoid biosynthesis	18055012, 18039758, 18056072, 18054041, 18037494, 18039951, 18041695, 18042755, 18038755, 18053309,	18053360, 18054042, 18035159, 18034103, 18054047, 18034834, 18049295, 18034599, 18031616,	18051976, 18049083, 18038754, 18054054, 18036716, 18039146, 18031578, 18038441, 18034937,	18042041, 18035066, 18033641, 18054044, 18050641, 18051922, 18052964, 18036737, 18049272,	18039359, 18050729, 18054046, 18046011, 18035645, 18038866, 18033897, 18038313, 18032305,
Flavonoid biyosentezi	18044502, 18053379, 18053177, 18042181, 18053381, 18031840, 18054377, 18053702, 18035583, 18042808, 18040911, 18035875, 18044391, 18051925, 18043598, 18037512, 18041930, 18042411, 18037380, 18044100,	18042812, 18033347, 18033739, 18055509, 18046700, 18055676, 18033472, 18040645, 18035447, 18038211, 18054378, 18032097, 18034351, 18034881, 18044359, 18054583, 18052259, 18043023, 18050323,	18049358, 18052870, 18049361, 18041854, 18053375, 18035420, 18041931, 18034884, 18041836, 18041446, 18047966, 18038380, 18040550, 18034731, 18034470, 18036490, 18049529, 18041188, 18047106,	18053176, 18049363, 18053378, 18053382, 18041447, 18034652, 18044387, 18049344, 18035960, 18049715, 18048923, 18046364, 18037906, 18041638, 18033528, 18034977, 18047485, 18055761, 18046978,	18053380, 18049362, 18036793, 18036794, 18046866, 18053694, 18053376, 18043319, 18034507, 18041637, 18046699, 18043027, 18042352, 18053057, 18037507, 18045106, 18033231, 18048580, 18040739,

Alfa-linolenik asit metabolizması	18042245, 18037981, 18050569, 18042246, 18038330, 18045592, 18043840, 18053047, 18036802, 18034674, 18046556, 18048357, 18031375, 18034101, 18036259, 18053048, 18039028, 18042022, 18051020, 18052053, 18052054, 18052336, 18052310, 18043839, 18031780, 18046717, 18049300, 18046716, 18047636, 18038848, 18031834, 18038849, 18043081, 18044018
Monoterpenoid biyosentezi	18047035, 18051782, 18033168, 18051781, 18045957
ABC taşıyıcıları	18033555, 18041872, 18034439, 18039618, 18038354, 18052594, 18034107, 18047313, 18054882, 18046661, 18049805, 18035829, 18054883, 18039484, 18046591, 18034929, 18034762, 18035930, 18042477, 18034796, 18045900, 18047120, 18043506, 18036425, 18038685, 18031296, 18038312, 18031478, 18041642, 18055584, 18053067, 18039121, 18038059, 18039076, 18053179, 18037160, 18053068, 18038750, 18033086, 18039122, 18035967, 18036098, 18038317, 18054974, 18037937, 18040406, 18043701, 18039617, 18051066, 18035983, 18055524, 18047578, 18050499, 18042240, 18036075, 18031564
Zeatin biyosentezi	18033290, 18038757, 18037360, 18031300, 18055306, 18042369, 18034430, 18035638, 18033954, 18035477, 18042102, 18039745, 18032372, 18033346, 18033392, 18035314, 18041313, 18044893, 18053901, 18042746
RNA polimeraz	18053823, 18055184, 18048346, 18047702, 18052966, 18047703, 18031245, 18047551, 18035126, 18052623, 18036133, 18055395, 18051151, 18040228, 18032894, 18033478, 18051516, 18047450, 18032060, 18054390, 18037052, 18039845, 18048819, 18054696, 18050903, 18054703, 18042563, 18054699, 18044450, 18034346, 18054926, 18033198, 18054925, 18054706, 18052308, 18051652, 18054697, 18045512, 18052618, 18040781, 18051024, 18053245, 18035429, 18035893, 18032305, 18039461, 18050499
Bitki hormonu sinyal transdüksiyonu	18036821, 18037867, 18047854, 18054772, 18037834, 18042908, 18033692, 18036810, 18031396, 18033717, 18035691, 18054144, 18054143, 18054157, 18035690, 18054150, 18050978, 18040658, 18032939, 18037072, 18054151, 18045043, 18035582, 18051252, 18033982, 18055572, 18032439, 18046752, 18055640, 18055646, 18054158, 18036412, 18045471, 18055838, 18049926, 18045532, 18036366, 18031816, 18043519, 18051952, 18032320, 18049882, 18040766, 18041280, 18047665, 18043925, 18031787, 18039863, 18034253, 18041777, 18044568, 18034803, 18032066, 18039631, 18044840, 18044653, 18032270, 18046570, 18039681, 18051770, 18035901, 18035441, 18039069, 18044060, 18035868,

	18039469, 18047689, 18049641, 18040774, 18044846, 18046353, 18033058, 18036413, 18040807, 18046599, 18033214, 18034724, 18048976, 18031456, 18040694, 18051172, 18033515, 18033792, 18041259, 18035850, 18035057, 18036868, 18040845, 18049819, 18036872, 18035603, 18036750, 18031527, 18051393, 18047823, 18039015, 18035062, 18032913, 18036454, 18036726, 18045763, 18032999, 18038652, 18031319, 18034800, 18043514, 18048788, 18055574, 18037691, 18045549, 18033385, 18050340, 18041590, 18049253, 18031668, 18033189, 18049254, 18047048, 18045554, 18041849, 18037581, 18054737, 18040548, 18047507, 18055004, 18045333, 18048162, 18037314, 18048122, 18053390, 18053236, 18037167, 18055059, 18039786, 18054641, 18045569, 18055696, 18035349, 18055439, 18047025, 18043542, 18040396, 18044573, 18053441, 18055298, 18054580, 18045530, 18052162, 18032250, 18043024, 18043385, 18045552, 18047543, 18047146, 18041816, 18045528, 18044720, 18036305, 18036545, 18042156, 18054871, 18034994, 18043475, 18038777, 18047613, 18034429, 18032345, 18046894, 18049391, 18050616, 18042595, 18033751, 18052304, 18055510, 18056082, 18038684, 18048546, 18049210, 18045523, 18044397, 18054163, 18045294, 18054638, 18045550, 18038324, 18039286, 18051150, 18040224, 18054074, 18050000, 18043434, 18048380, 18054654, 18031727, 18047683, 18033660, 18042938, 18038402, 18050899, 18056083, 18047873, 18031274, 18049835
Linoleik asit metabolizması	18047389, 18047712, 18040235, 18031426, 18053047, 18033621, 18031375, 18046264, 18034101, 18048256, 18047393, 18053048, 18045345, 18050625, 18052683, 18052053, 18052054, 18045343, 18055120, 18047714, 18043839, 18052043, 18043046, 18031834

EK 8. Altıntop albedo ve kallus örnekleri arasında tespit edilen yolaklar ile farklı seviyelerde ifade edilen genler

Yolak	Farklı Seviyelerde İfade Olan Genler
Sekonder metabolit biyosentezi	18042245, 18043889, 18034137, 18053176, 18033040,
	18044502, 18055365, 18049363, 18042246, 18053328,
	18049361, 18050721, 18037981, 18032203, 18046254,
	18046299, 18049358, 18033739, 18042182, 18049345,
	18038291, 18043796, 18036176, 18046882, 18032361,
	18048749, 18045778, 18050152, 18046298, 18036678,
	18053047, 18049362, 18046713, 18042181, 18045260,
	18049951, 18046505, 18053797, 18055533, 18042812,
	18048829, 18042368, 18053177, 18037660, 18032205,
	18033947, 18055509, 18036838, 18043888, 18041200,
	18041651, 18031784, 18032436, 18054042, 18040531,
	18046341, 18038586, 18044452, 18040881, 18031840,
	18043945, 18038757, 18054683, 18045315, 18052457,
	18038330, 18050151, 18036802, 18047456, 18042301,
	18031839, 18044659, 18050571, 18036925, 18039140,
	18055363, 18052460, 18036794, 18034674, 18054598,
	18033275, 18032624, 18036793, 18039359, 18045592,
	18044918, 18052997, 18043917, 18042369, 18037360,
	18035584, 18046576, 18043571, 18032359, 18036080,
	18049347, 18051788, 18041854, 18052395, 18048242,
	18047440, 18034756, 18038197, 18052122, 18038596,
	18037787, 18039123, 18052466, 18054620, 18032287,
	18036308, 18049346, 18053799, 18042069, 18031198,
	18034358, 18034459, 18046700, 18044642, 18044432,
	18052501, 18042220, 18052462, 18041946, 18042779,
	18033879, 18035112, 18048849, 18039549, 18031841,
	18042075, 18033347, 18045944, 18055294, 18036805,
	18055806, 18050706, 18054210, 18053382, 18049083,
	18035482, 18043035, 18039962, 18043840, 18038076,
	18046556, 18054754, 18033532, 18039477, 18050546,
	18045561, 18041861, 18037327, 18050524, 18050729,
	18043319, 18032690, 18038827, 18052071, 18034658,
	18036289, 18035126, 18041531, 18042630, 18053048,
	18051852, 18036268, 18043266, 18054207, 18044430,
	18041945, 18042815, 18034362, 18033838, 18046916,
	18044009, 18054575, 18046501, 18034430, 18052497,
	18049613, 18037191, 18047923, 18044762, 18034322,
	18045928, 18041198, 18044011, 18031746, 18042221,
	18037287, 18040111, 18038426, 18044431, 18055121,
	18043574, 18043086, 18043771, 18045747, 18036914,
	18044371, 18048798, 18038860, 18034507, 18043059,
	18036967, 18051456, 18040645, 18042868, 18035442,
	18032353, 18052503, 18055676, 18044066, 18035638,
	18054377, 18041776, 18049500, 18042438, 18035960,
	18036259, 18033756, 18036789, 18053165, 18037442,
	18048340, 18040739, 18044387, 18044098, 18042665,

	18034982,	18049232,	18034523,	18034652,	18036720,
	18037601,	18039171,	18035451,	18032527,	18047932,
	18032887,	18052072,	18044271,	18042673,	18052360,
	18048357,	18044122,	18040529,	18049344,	18051920,
	18031467,	18056023,	18034884,	18031181,	18037064,
	18031375,	18045463,	18052500,	18036082,	18032915,
	18039660,	18046114,	18042617,	18039720,	18039181,
	18032333,	18045694,	18049696,	18034101,	18043657,
	18036840,	18043267,	18045690,	18055481,	18038922,
	18053353,	18036267,	18045394,	18031241,	18031595,
	18045562,	18037658,	18042895,	18038024,	18031254,
	18045385,	18031956,	18046023,	18040008,	18037475,
	18047044,	18051971,	18040745,	18034596,	18039663,
	18036870,	18031249,	18039952,	18034203,	18050513,
	18036211,	18047191,	18035066,	18042022,	18056072,
	18041447,	18051945,	18040291,	18041933,	18039082,
	18037955,	18051670,	18045777,	18032177,	18049302,
	18045250,	18044644,	18056044,	18036721,	18032270,
	18038866,	18049369,	18042079,	18043998,	18054901,
	18041638,	18035589,	18041964,	18041083,	18047480,
	18037523,	18052333,	18047656,	18035333,	18037192,
	18042520,	18052980,	18046590,	18051991,	18031724,
	18035477,	18038306,	18054178,	18055522,	18045583,
	18038162,	18051070,	18039250,	18039063,	18038754,
	18048200,	18031223,	18054351,	18044197,	18047806,
	18040277,	18039162,	18042840,	18045386,	18044238,
	18041337,	18035870,	18039028,	18039077,	18055984,
	18034283,	18054605,	18039759,	18045413,	18055161,
	18037750,	18039443,	18047033,	18031532,	18048983,
	18037202,	18054921,	18043706,	18035834,	18054769,
	18038331,	18039362,	18040665,	18033472,	18033471,
	18049291,	18033113,	18038903,	18041931,	18036206,
	18035741,	18052498,	18045387,	18038254,	18038372,
	18035484,	18044636,	18038722,	18042932,	18047003,
	18032950,	18034211,	18038211,	18049733,	18049734,
	18043707,	18039072,	18037752,	18034351,	18036987,
	18046698,	18034921,	18043280,	18037292,	18050625,
	18055420,	18043279,	18038971,	18045727,	18041446,
	18040730,	18043258,	18037588,	18038527,	18040761,
	18043410,	18051020,	18054046,	18035875,	18036047,
	18034103,	18041303,	18040911,	18033218,	18035844,
	18042293,	18054041,	18050006,	18039078,	18039168,
	18043027,	18033168,	18032503,	18035688,	18042102,
	18053428,	18034008,	18038380,	18046699,	18052487,
	18055442,	18045039,	18051174,	18043310,	18054378,
	18032971,	18037850,	18041363,	18042421,	18048923,
	18046011,	18044393,	18046364,	18042032,	18051782,
	18053087,	18048227,	18049715,	18052054,	18033231,
	18037906,	18036100,	18040475,	18041215,	18043514,
	18052053,	18053427,	18045038,	18044645,	18045084,
	18041090,	18050174,	18037494,	18047966,	18035851,
	18044657,	18039960,	18036978,	18045086,	18042094,

	18046174, 18037031, 18037868, 18047244, 18041998,				
Metabolik yollar	18042245,	18043889,	18034137,	18053176,	18047042,
	18040753,	18044502,	18047848,	18055365,	18042246,
	18053328,	18042401,	18047703,	18040256,	18037981,
	18031245,	18032203,	18048346,	18046254,	18046299,
	18033739,	18042182,	18047698,	18049345,	18046170,
	18038291,	18043796,	18047702,	18047847,	18036176,
	18037602,	18046882,	18032361,	18048749,	18045852,
	18052474,	18045778,	18050152,	18046298,	18036678,
	18053615,	18053047,	18053823,	18034444,	18055118,
	18046713,	18042181,	18045260,	18050746,	18046505,
	18053797,	18051549,	18034249,	18055533,	18042812,
	18048829,	18049606,	18043653,	18042368,	18053177,
	18037660,	18032205,	18033947,	18055509,	18036838,
	18043888,	18041200,	18050256,	18045520,	18047846,
	18041651,	18031784,	18032436,	18042569,	18044435,
	18035315,	18052848,	18054042,	18055217,	18040531,
	18046341,	18038586,	18044309,	18044452,	18040881,
	18055119,	18031840,	18043945,	18038757,	18043967,
	18045315,	18036821,	18052457,	18038330,	18050151,
	18036802,	18047456,	18053111,	18042301,	18050244,
	18039438,	18044713,	18052855,	18045612,	18052688,
	18055218,	18044659,	18040169,	18040170,	18050571,
	18036925,	18039140,	18055363,	18036794,	18046005,
	18034674,	18054598,	18038796,	18033275,	18034655,
	18041775,	18052901,	18032624,	18036793,	18039359,
	18048583,	18045592,	18044918,	18034517,	18052997,
	18046970,	18037600,	18037360,	18035584,	18046576,
	18043571,	18032359,	18036080,	18031426,	18049347,
	18045352,	18040228,	18052032,	18035010,	18052395,
	18048242,	18047440,	18044278,	18046437,	18034756,
	18038197,	18052122,	18038596,	18032893,	18037787,
	18039123,	18050078,	18052466,	18040123,	18044924,
	18054620,	18038615,	18041989,	18032287,	18036308,
	18048680,	18038387,	18049346,	18053799,	18042069,
	18033848,	18031198,	18051545,	18034358,	18055373,
	18034459,	18056047,	18044642,	18048445,	18042135,
	18041679,	18052501,	18052860,	18052634,	18048155,
	18042220,	18052462,	18041946,	18042510,	18042779,
	18055551,	18044560,	18049897,	18035112,	18047200,
	18048849,	18036645,	18039549,	18031841,	18042075,
	18033347,	18047845,	18045944,	18036805,	18031419,
	18048151,	18046879,	18055806,	18050706,	18054210,
	18054071,	18035158,	18053382,	18049083,	18035482,
	18043035,	18039962,	18052861,	18041631,	18055395,
	18043840,	18055586,	18054549,	18038076,	18046556,
	18054754,	18033532,	18046547,	18039477,	18050546,
	18045561,	18041861,	18037327,	18050524,	18050729,
	18035359,	18043319,	18052598,	18037093,	18033394,

	18050607, 18049190, 18038827, 18049562, 18034658, 18040769, 18035126, 18041531, 18042630, 18053048, 18054542, 18054194, 18034927, 18043266, 18054207, 18047568, 18045018, 18041945, 18042815, 18033838, 18046916, 18044009, 18040399, 18054575, 18044690, 18046501, 18034430, 18052497, 18053519, 18032723, 18049613, 18049220, 18053263, 18037191, 18037749, 18044273, 18044762, 18034322, 18045928, 18041898, 18050900, 18034986, 18041198, 18031357, 18044011, 18031746, 18042221, 18037287, 18049189, 18040473, 18040111, 18038426, 18055121, 18052623, 18048701, 18037725, 18043574, 18043086, 18041655, 18045747, 18033025, 18055495, 18041368, 18038940, 18036914, 18049565, 18044371, 18032035, 18048798, 18038860, 18034507, 18054889, 18043059, 18041852, 18036967, 18040645, 18042868, 18035442, 18032353, 18052503, 18036681, 18055676, 18035638, 18054377, 18053261, 18035419, 18038673, 18038597, 18041176, 18041776, 18048333, 18049269, 18049500, 18034457, 18041134, 18041697, 18042438, 18044485, 18035960, 18036259, 18039976, 18033756, 18046264, 18036789, 18053165, 18035711, 18050848, 18037442, 18032221, 18048340,
Flavonoid biyosentezi	18053176, 18044502, 18049363, 18049361, 18049358, 18033739, 18049362, 18042181, 18042812, 18053177, 18055509, 18041651, 18031840, 18036794, 18036793, 18041854, 18032287, 18046700, 18042220, 18033347, 18055806, 18053382, 18038076, 18043319, 18042221, 18038426, 18034507, 18040645, 18055676, 18054377, 18035960, 18040739, 18044387, 18034652, 18035451, 18040529, 18049344, 18034884, 18036840, 18042895, 18037475, 18036870, 18041447, 18041933, 18041638, 18047480, 18039162, 18039759, 18033472, 18041931, 18038211, 18034351, 18041446, 18035875, 18040911, 18043027, 18034008, 18044391, 18038380, 18046699, 18054378, 18048923, 18046364, 18049715, 18033231, 18037906, 18041215, 18047966, 18042094, 18041998, 18033139, 18042352, 18034731, 18041428, 18051925, 18034977, 18052259, 18034881, 18043598, 18053693, 18054583, 18048579, 18034470, 18041930, 18042411, 18045106, 18036466, 18037507, 18041188, 18048580, 18053057, 18053379, 18049333, 18035420, 18052870, 18035124, 18033292, 18037512, 18043273, 18053375, 18055761, 18041836, 18053376, 18041932, 18037380, 18041639, 18045744
Fotosentez	18050746, 18035077, 18045520, 18042569, 18043967, 18040123, 18052634, 18033147, 18044560, 18031419, 18046879, 18041631, 18042493, 18046547, 18052598, 18037749, 18055495, 18049565, 18049269, 18050848, 18054593, 18041845, 18045866, 18036420, 18043195, 18044399, 18043060, 18034566, 18046168, 18051679, 18054197, 18037401, 18051897, 18051702, 18050406, 18049304

Alfa-linolenik asit metabolizması	18042245, 18042246, 18037981, 18053047, 18038330, 18036802, 18034674, 18045592, 18050569, 18043840, 18046556, 18053048, 18036259, 18048357, 18031375, 18034101, 18042022, 18039028, 18038331, 18051020, 18052054, 18052053, 18056133, 18052310, 18031780, 18052336, 18038849, 18046716, 18046717, 18049300, 18047636, 18038848, 18031834, 18043839
Monoterpenoid biyosentezi	18033168, 18051782, 18047034, 18045957, 18047035
Flavone and flavonol biyosentezi	18042182, 18038291, 18046505, 18043945, 18039140, 18053382, 18046501, 18032784, 18032105, 18032408, 18049232, 18055186, 18032132, 18050842, 18032177, 18038126, 18044555, 18035875, 18040911, 18050006, 18035688, 18044391, 18045039, 18033231, 18045038, 18033224, 18044783, 18044554, 18048366, 18046030, 18055666, 18048368, 18032212, 18032737, 18048579, 18048580, 18053379, 18052870, 18035124, 18053375, 18053376, 18045744
Galaktoz metabolizması	18035315, 18038197, 18038596, 18038387, 18055373, 18036645, 18037093, 18047580, 18040399, 18041898, 18034986, 18038940, 18032035, 18044387, 18056073, 18051843, 18042860, 18050513, 18040789, 18046590, 18055984, 18037811, 18039112, 18033121, 18031271, 18044188, 18050124, 18049954, 18040981, 18050892, 18040199, 18035854, 18047684, 18052664, 18048835, 18033032, 18052665, 18052940, 18031328, 18034941, 18055225, 18055374, 18035909, 18031180, 18054860, 18046973, 18031179, 18052809, 18052552, 18055034, 18038738, 18032875, 18049584, 18033373, 18039940, 18042074, 18034191, 18051695, 18036428, 18037161, 18044184, 18035117
Limonen and pinen degradasyonu	18041200, 18054620, 18041946, 18042779, 18043035, 18041531, 18041945, 18044009, 18041198, 18044011, 18037287, 18043086, 18042868, 18037442, 18044098, 18037064, 18045694, 18045385, 18043998, 18045386, 18035834, 18045387, 18044393, 18036100, 18042767, 18035820, 18043036, 18042343, 18043046, 18035522,
Akridon alkaloid biyosentezi	18046299, 18050152, 18046298, 18046505, 18039140, 18046501, 18049232, 18037523, 18037588, 18033218, 18050006, 18045039, 18045038, 18048366, 18050156, 18048368, 18050154
Karotenoid biyosentezi	18055012, 18054042, 18039359, 18049083, 18050729, 18033641, 18037601, 18049208, 18039952, 18035066, 18056072, 18038866, 18041964, 18038754, 18042041, 18035870, 18039758, 18054046, 18034103, 18054041, 18046011, 18037494, 18050641, 18039951, 18052964, 18039146, 18054054, 18041695, 18038755, 18038441, 18031578, 18042755, 18040757, 18036737, 18031616, 18033004, 18038313, 18034937, 18034599, 18043465,

	18053309, 18048075, 18039008
ABC taşıyıcıları	18034439, 18033555, 18038354, 18047313, 18035829, 18041872, 18054884, 18039618, 18052594, 18054882, 18038353, 18052595, 18039076, 18049805, 18034762, 18035930, 18042477, 18047120, 18043506, 18031478, 18031296, 18042478, 18041642, 18036425, 18038685, 18034796, 18038312, 18044764, 18037021, 18053067, 18039121, 18053179, 18047578, 18038750, 18055584, 18038059, 18055524, 18037160, 18039617, 18036118, 18052593, 18035967, 18043701, 18040406, 18045054, 18037937, 18053068, 18054974, 18033086, 18039122, 18039138,
Linoleik asit metabolizması	18053047, 18040235, 18031426, 18053048, 18046264, 18047712, 18031375, 18034101, 18047389, 18047387, 18047393, 18052683, 18050625, 18052054, 18052053, 18045343, 18055120, 18047714, 18033545, 18042367, 18044579, 18044580, 18052043, 18033621, 18043046, 18044581, 18044582, 18031834, 18043839
İzoflavonoid biyosentezi	18054620, 18051852, 18032784, 18032105, 18032408, 18055186, 18037064, 18032132, 18050842, 18038126, 18035834, 18044555, 18033224, 18039960, 18044783, 18044554, 18032717, 18033522, 18046030, 18055666, 18051641, 18032737, 18035820, 18031831, 18049333
Zeatin biyosentezi	18038757, 18055306, 18031300, 18042369, 18037360, 18034430, 18033290, 18035638, 18035477, 18042102, 18033346, 18032372, 18033392, 18042746, 18040880, 18041313, 18045063
Antosiyanin biyosentezi	18054015, 18047244, 18037893
RNA polimeraz	18047703, 18031245, 18048346, 18047702, 18053823, 18052848, 18053111, 18040228, 18055395, 18035126, 18052623, 18036133, 18055184, 18033167, 18037052, 18051151, 18047551, 18047450, 18052966, 18039845, 18054390, 18054696, 18050903, 18044450, 18033198, 18054699, 18054925, 18054926, 18045512, 18052308, 18054697, 18053245, 18052618, 18048819, 18051024, 18054092, 18040781, 18041007, 18050693, 18042027, 18045868